



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Wydział Biologii

Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych

**Rola transporterów błonowych z rodziny CTR oraz
metalochaperonów w regulacji metabolizmu miedzi w chorobie
Menkesa – badania na modelu zwierzęcym.**

Olga Haberkiewicz

Rozprawa doktorska
wykonana pod opieką
dr hab. Małgorzaty Lenartowicz
w Zakładzie Genetyki i Ewolucjonizmu
Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych

Kraków 2019

*Pragnę złożyć serdeczne podziękowania
mojej promotor Pani **dr hab. Małgorzacie Lenartowicz**,
za poświęcony czas, cenne porady, przekazaną wiedzę i doświadczenie,
a także za pomoc w redagowaniu obecnej pracy.*

*Bardzo dziękuję **mgr Aleksandrze Bednarz** oraz **mgr Mateuszowi Ogórkowi**,
za okazaną mi pomoc, a przede wszystkim za stworzenie wspaniałej atmosfery pracy.*

*Serdeczne podziękowania przesyłam w kierunku
mgr Anety Jończy oraz **mgr Patrycji Kurowskiej**, za ich nieocenioną pomoc,
zaangażowanie, ogromne wsparcie oraz wszystkie cenne wskazówki.*

*Pragnę również podziękować
Panu **Prof. Zbigniewowi Polańskiemu** oraz Ś. P. Pani **Prof. Józefie Styrnie**
za umożliwienie realizacji obecnej pracy doktorskiej w Zakładzie Genetyki i Ewolucjonizmu,
a także za wiedzę oraz cenne uwagi, które otrzymałam w trakcie
prowadzonych badań oraz w toku studiów doktoranckich.*

Spis treści

1.	Streszczenie.....	9
2.	Abstract	12
3.	Wstęp.....	15
3. 1.	Rola miedzi w organizmie ssaków.....	15
3. 2.	Wchłanianie i transport miedzi w organizmie ssaków.....	16
3. 3.	Transport miedzi na poziomie komórki.....	19
3. 4.	Charakterystyka białek transportujących jony miedzi w obrębie komórki.....	21
3. 4. 1.	Białko CTR1 – główny błonowy transporter jonów miedzi.....	21
3. 4. 2.	Białko CTR2 – transporter jonów miedzi wbudowany w błony endosomów i lizosomów.....	24
3. 4. 3.	Białko ATOX1 – cytoplazmatyczny transporter jonów miedzi i czynnik transkrypcyjny.....	25
3. 4. 4.	Białko CCS – największy z metalochaperonów.....	27
3. 4. 5.	Białko COX17 – metalochaperon transportujący jony miedzi do mitochondrium.....	30
3. 5.	Białka ATP7A oraz ATP7B – ATPazy transportujące jony miedzi.....	31
3. 6.	Mutacje w obrębie genu <i>ATP7B</i> prowadzą u człowieka do choroby Wilsona.....	35
3. 7.	Choroba Menkesa – dziedziczne zaburzenie metabolizmu miedzi u człowieka wywołane mutacją w genie <i>ATP7A</i>	36
3. 8.	Myszy z mutacją w genie <i>Atp7a</i> – charakterystyka mutacji mottled.....	39
3. 9.	Mutanty <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> – zwierzęcy model choroby Menkesa.....	41
4.	Cele pracy.....	44
5.	Wykaz stosowanych skrótów.....	47
6.	Materiały i metody.....	48
6. 1.	Odczynniki, materiały oraz aparatura laboratoryjna wykorzystane w trakcie prowadzonych badań.....	48
6. 2.	Materiał biologiczny.....	51
6. 2. 1.	Zwierzęta.....	51
6. 2. 2.	Procedura podawania chlorku miedzi (II) zwierzętom doświadczalnym.....	52
6. 2. 3.	Grupy badane.....	53
6. 2. 3. 1.	Zwierzęta 14-dniowe.....	53
6. 2. 3. 2.	Zwierzęta 46-dniowe.....	54
6. 2. 3. 3.	Zwierzęta 6 miesięczne (około 180-dniowe)	55
6. 2. 4.	Oznaczenie masy ciała badanych myszy.....	55
6. 2. 5.	Uśmiercanie zwierząt.....	56

6. 3.	Zastosowane metody.....	56
6. 3. 1.	Oznaczenie zawartości miedzi w tkankach.....	56
6. 3. 2.	Analiza ekspresji wybranych genów związanych z metabolizmem miedzi.....	57
6. 3. 2. 1.	Izolacja RNA z organów.....	57
6. 3. 2. 2.	Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	58
6. 3. 2. 3.	Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	59
6. 3. 2. 4.	Elektroforeza w żelu agarozowym.....	61
6. 3. 2. 5.	Badanie poziomu ekspresji genów metodą real time PCR (PCR w czasie rzeczywistym; ang. <i>real time PCR</i>)	62
6. 3. 3.	Analiza statystyczna.....	63
6. 3. 4.	Badanie ekspresji białek z wykorzystaniem reakcji immunofluorescencji.....	64
6. 3. 4. 1.	Przygotowanie szkiełek podstawowych.....	64
6. 3. 4. 2.	Przygotowanie skrawków mrożeniowych i przeprowadzenie reakcji immunofluorescencyjnej w celu zbadania komórkowej lokalizacji białek CTR1 oraz ATOX1.....	64
6. 3. 4. 3.	Przeprowadzenie reakcji kolokalizacji białek CTR1 i AQP1.....	66
6. 3. 4. 4.	Analiza mikroskopowa.....	68
6. 3. 5.	Reakcja Western blot.....	68
6. 3. 6.	Analiza aktywności białka SOD1.....	70
7.	Wyniki.....	72
7. 1.	Analiza wpływu iniekcji chlorkiem miedzi (II) na zmiany masy ciała.....	72
7. 1. 1.	Analiza wpływu iniekcji chlorkiem miedzi (II) na zmiany masy ciała – okres od 2 do 46 dnia życia.....	72
7. 1. 2.	Analiza wpływu terapii iniekcji chlorkiem miedzi (II) na zmiany masy ciała – osobniki 6 miesięczne.....	78
7. 2.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie.....	80
7. 2. 1.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie – osobniki 14-dniowe.....	80
7. 2. 2.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie – osobniki 46-dniowe.....	81
7. 2. 3.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie – osobniki 6 miesięczne.....	82
7. 3.	Analiza zawartości miedzi w nerkach.....	83
7. 3. 1.	Analiza zawartości miedzi w nerkach – osobniki 14-dniowe.....	83
7. 3. 2.	Analiza zawartości miedzi w nerkach – osobniki 46-dniowe.....	84
7. 3. 3.	Analiza zawartości miedzi w nerkach – osobniki 6 miesięczne.....	85
7. 4.	Analiza poziomu ekspresji genu i białka <i>Ctr1</i> /CTR1 oraz badanie komórkowej lokalizacji białka CTR1 w nerkach.....	86
7. 4. 1.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Ctr1</i> w nerkach – osobniki 14-dniowe.....	87

7. 4. 2.	Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w obrębie kory i rdzenia nerki – osobniki 14-dniowe.....	89
7. 4. 2. 1.	Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w części korowej nerki – osobniki 14-dniowe.....	89
7. 4. 2. 2.	Analiza komórkowej lokalizacji białka CTR1 w części rdzennej nerki – osobniki 14-dniowe.....	91
7. 4. 2. 3.	Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w nerkach, kolokalizacja białka CTR1 oraz białka AQP1 - osobniki 14-dniowe.....	93
7. 4. 3.	Analiza poziomu ekspresji białka CTR1 w nerkach – osobniki 14-dniowe.....	96
7. 4. 4.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Ctr1</i> w nerkach – osobniki 46-dniowe.....	98
7. 4. 5.	Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w obrębie kory i rdzenia nerki – osobniki 46-dniowe.....	99
7. 4. 5. 1.	Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w części korowej nerki – osobniki 46-dniowe.....	99
7. 4. 5. 2.	Analiza komórkowej lokalizacji białka CTR1 w części rdzennej nerki – osobniki 46-dniowe.....	101
7. 4. 6.	Analiza poziomu ekspresji białka CTR1 w nerkach – osobniki 46-dniowe.....	103
7. 4. 7.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Ctr1</i> w nerkach – osobniki 6 miesięczne.....	105
7. 4. 8.	Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w obrębie kory i rdzenia nerki – osobniki 6 miesięczne.....	105
7. 4. 8. 1.	Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w części korowej nerki – osobniki 6 miesięczne.....	106
7. 4. 8. 2.	Analiza komórkowej lokalizacji białka CTR1 w części rdzennej nerki – osobniki 6 miesięczne.....	108
7. 4. 8. 3.	Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w nerkach, kolokalizacja białka CTR1 oraz białka AQP1 - osobniki 6 miesięczne.....	110
7. 4. 9.	Analiza poziomu ekspresji białka CTR1 w nerkach – osobniki 6 miesięczne.....	113
7. 5.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Ctr2</i> w nerkach.....	114
7. 5. 1.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Ctr2</i> w nerkach – osobniki 14-dniowe.....	114
7. 5. 2.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Ctr2</i> w nerkach – osobniki 46-dniowe.....	116
7. 5. 3.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Ctr2</i> w nerkach – osobniki 6 miesięczne.....	116
7. 6.	Analiza poziomu ekspresji genu oraz białka <i>Atox1</i> /ATOX1, a także komórkowej lokalizacji białka ATOX1 w nerkach.....	117
7. 6. 1.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Atox1</i> w nerkach – osobniki 14-dniowe.....	118
7. 6. 2.	Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka ATOX1 w obrębie kory nerki – osobniki 14-dniowe.....	119

7. 6. 3.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Atox1</i> w nerkach – osobniki 46-dniowe.....	122
7. 6. 4.	Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka ATOX1 w obrębie kory nerki – osobniki 46-dniowe.....	123
7. 6. 5.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Atox1</i> w nerkach – osobniki 6 miesięczne.....	125
7. 6. 6.	Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka ATOX1 w obrębie kory nerki – osobniki 6 miesięczne.....	126
7. 7.	Analiza poziomu ekspresji genu oraz białka <i>Ccs/CCS</i> w nerkach.....	128
7. 7. 1.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Ccs</i> w nerkach – osobniki 14-dniowe.....	129
7. 7. 2.	Analiza poziomu ekspresji białka CCS w nerkach – osobniki 14-dniowe.....	130
7. 7. 3.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Ccs</i> w nerkach – osobniki 46-dniowe.....	133
7. 7. 4.	Analiza poziomu ekspresji białka CCS w nerkach – osobniki 46-dniowe.....	133
7. 7. 5.	Analiza poziomu ekspresji genu <i>Ccs</i> w nerkach – osobniki 6 miesięczne.....	135
7. 7. 6.	Analiza poziomu ekspresji białka CCS w nerkach – osobniki 6 miesięczne.....	135
7. 8.	Analiza poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach.....	137
7. 8. 1.	Analiza poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach – osobniki 14-dniowe.....	138
7. 8. 2.	Analiza poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach – osobniki 46-dniowe.....	141
7. 8. 3.	Analiza poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach – osobniki 6 miesięczne.....	143
8.	Dyskusja.....	145
8. 1.	Choroba Menkesa, jej zwierzęcy model (mutanty <i>Atp7a^{mo-ms}</i>) oraz stosowana terapia chlorkiem miedzi (II)	145
8. 2.	Analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na ogólną kondycję zwierząt, wyrażającą się przyrostem masy ciała.....	148
8. 2. 1.	Analiza wpływu iniekcji chlorkiem miedzi (II) na zmiany masy ciała oraz fenotypu w okresie od 2 dnia do 6 miesiąca życia – genotyp dziki.....	148
8. 2. 2.	Analiza wpływu iniekcji chlorkiem miedzi (II) na zmiany masy ciała oraz fenotypu w okresie od 2 dnia do 6 miesiąca życia – mutanty <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i>	150
8. 3.	Analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na zawartość miedzi w wątrobie.....	151
8. 3. 1.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników 14-dniowych.....	153
8. 3. 1. 1.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	153
8. 3. 1. 2.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> niepoddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	155
8. 3. 1. 3.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	156
8. 3. 2.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników 46-dniowych.....	157

8.3.2.1.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	157
8.3.2.2.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie mutantów <i>mosaic</i> (<i>Atp7a^{mo-ms}</i>) poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	158
8.3.3.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników 6 miesięcznych.....	159
8.3.3.1.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 6 miesięczne.....	159
8.3.3.2.	Analiza zawartości miedzi w wątrobie mutantów <i>mosaic</i> (<i>Atp7a^{mo-ms}</i>) poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 6 miesięczne.....	159
8.4.	Analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na zawartość miedzi w nerkach.....	160
8.4.1.	Analiza zawartości miedzi w nerkach osobników 14-dniowych.....	163
8.4.1.1.	Analiza zawartości miedzi w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	163
8.4.1.2.	Analiza zawartości miedzi w nerkach mutantów <i>mosaic</i> (<i>Atp7a^{mo-ms}</i>) niepoddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	164
8.4.1.3.	Analiza zawartości miedzi w nerkach mutantów <i>mosaic</i> (<i>Atp7a^{mo-ms}</i>) poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	165
8.4.2.	Analiza zawartości miedzi w nerkach osobników 46-dniowych.....	166
8.4.2.1.	Analiza zawartości miedzi w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	167
8.4.2.2.	Analiza zawartości miedzi w nerkach mutantów <i>mosaic</i> (<i>Atp7a^{mo-ms}</i>) poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	167
8.4.3.	Analiza zawartości miedzi w nerkach osobników 6 miesięcznych.....	169
8.4.3.1.	Analiza zawartości miedzi w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 6 miesięczne.....	169
8.4.3.2.	Analiza zawartości miedzi w nerkach mutantów <i>mosaic</i> (<i>Atp7a^{mo-ms}</i>) poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 6 miesięczne.....	169
8.5.	Analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na ekspresję genu i białka <i>Ctr1</i> /CTR1, a także komórkową lokalizację białka CTR1 w nerkach.....	170
8.5.1.	Analiza ekspresji genu <i>Ctr1</i> oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach 14-dniowych osobników.....	172
8.5.1.1.	Analiza ekspresji genu <i>Ctr1</i> oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach osobników o genotypie dzikim nieotrzymujących suplementacji CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	172
8.5.1.2.	Analiza ekspresji genu <i>Ctr1</i> oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	174

8. 5. 1. 3.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl</i> oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> niepoddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	177
8. 5. 1. 4.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl</i> oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	179
8. 5. 2.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl</i> oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach 46-dniowych osobników.....	180
8. 5. 2. 1.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl</i> oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach osobników o genotypie dzikim nieotrzymujących suplementacji CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	180
8. 5. 2. 2.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl</i> oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	181
8. 5. 2. 3.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl</i> oraz komórkowej lokalizacji białka CTR1 w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	183
8. 5. 3.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl</i> oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach 6 miesięcznych osobników.....	185
8. 5. 3. 1.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl</i> oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach osobników o genotypie dzikim nieotrzymujących suplementacji CuCl ₂ – osobniki 6 miesięczne....	185
8. 5. 3. 2.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl</i> oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 6 miesięczne.....	186
8. 5. 3. 3.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl</i> oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 6 miesięczne.....	187
8. 6.	Analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na ekspresję genu <i>Ctrl2</i> w nerkach.....	189
8. 6. 1.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl2</i> w nerkach osobników 14-dniowych.....	190
8. 6. 1. 1.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl2</i> w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	190
8. 6. 1. 2.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl2</i> w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> niepoddanych terapii CuCl ₂ oraz mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	190
8. 6. 2.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl2</i> w nerkach osobników 46-dniowych.....	191
8. 6. 2. 1.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl2</i> w nerkach osobników o genotypie dzikim oraz mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	191
8. 6. 3.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl2</i> w nerkach osobników 6 miesięcznych.....	192
8. 6. 3. 1.	Analiza ekspresji genu <i>Ctrl2</i> w nerkach osobników o genotypie dzikim oraz mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki	

6 miesięczne.....	192
8. 7. Analiza wpływu zastosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na ekspresję genu <i>Atox1</i> , a także wewnątrzkomórkową lokalizację białka ATOX1 w komórkach nerkach.....	193
8. 7. 1. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach 14-dniowych osobników.....	194
8. 7. 1. 1. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników o genotypie dzikim niepoddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	194
8. 7. 1. 2. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	195
8. 7. 1. 3. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> niepoddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	196
8. 7. 1. 4. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe	197
8. 7. 2. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników 46-dniowych.....	198
8. 7. 2. 1. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników o genotypie dzikim niepoddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	198
8. 7. 2. 2. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	198
8. 7. 2. 3. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	199
8. 7. 3. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach 6 miesięcznych osobników.....	200
8. 7. 3. 1. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników o genotypie dzikim niepoddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 6 miesięczne	200
8. 7. 3. 2. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 6 miesięczne.....	201
8. 7. 3. 3. Analiza ekspresji genu <i>Atox1</i> oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 6 miesięczne.....	201
8. 8. Analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na ekspresję genu i białka <i>Ccs/CCS</i> , także aktywność białka SOD1 w nerkach.....	203
8. 8. 1. Analiza ekspresji genu oraz białka <i>Ccs/CCS</i> , a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach osobników 14-dniowych.....	204
8. 8. 1. 1. Analiza ekspresji genu oraz białka <i>Ccs/CCS</i> , a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ –	

osobniki 14-dniowe.....	204
8. 8. 1. 2. Analiza ekspresji genu oraz białka <i>Ccs/CCS</i> , a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> niepoddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	206
8. 8. 1. 3. Analiza ekspresji genu oraz białka <i>Ccs/CCS</i> , a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 14-dniowe.....	207
8. 8. 2. Analiza ekspresji genu oraz białka <i>Ccs/CCS</i> , a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach osobników 46-dniowych.....	209
8. 8. 2. 1. Analiza ekspresji genu oraz białka <i>Ccs/CCS</i> , a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	209
8. 8. 2. 2. Analiza ekspresji genu oraz białka <i>Ccs/CCS</i> , a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 46-dniowe.....	210
8. 8. 3. Analiza ekspresji genu oraz białka <i>Ccs/CCS</i> , a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach osobników 6 miesięcznych.....	211
8. 8. 3. 1. Analiza ekspresji genu oraz białka <i>Ccs/CCS</i> , a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl ₂ – osobniki 6 miesięczne.....	212
8. 8. 3. 2. Analiza ekspresji genu oraz białka <i>Ccs/CCS</i> , a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach mutantów <i>mosaic (Atp7a^{mo-ms})</i> poddanych terapii CuCl ₂ – osobniki 6 miesięczne.....	212
9. Wnioski.....	215
10. Literatura.....	220

1. Streszczenie

Miedź jest mikroelementem niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania organizmu, a dzięki swym właściwościom oksydoredukcyjnym pełni rolę kofaktora wielu białek enzymatycznych. Zarówno nadmiar, jak i niedobór miedzi prowadzi do stanów patologicznych, dlatego też organizmy żywe wykształciły precyzyjną regulację transportu i metabolizmu tego pierwiastka. W komórkach ssaków występują trzy główne grupy białek biorących udział w utrzymaniu homeostazy miedzi. Pierwszą grupę stanowią transportery błonowe CTR1 i CTR2, przy pomocy których komórki pobierają jony miedzi. Druga grupa to cytoplazmatyczne transportery jonów miedzi, ATOX1, CCS i COX17, białka o charakterze metalochaperonów. Trzecią grupę tworzą zlokalizowane w błonach aparatu Golgiego ATPazy, ATP7A i ATP7B, białka pośredniczące w transporcie jonów miedzi do cząsteczek apo-enzymów oraz utrzymujące stały poziom miedzi w obrębie komórek.

W obecnej pracy przedstawiono wyniki badań nad ekspresją transporterów błonowych (CTR1 i CTR2) oraz wybranych metalochaperonów, w organach myszy, u których zaburzenia metabolizmu miedzi wywołane są mutacją, w zlokalizowanym na chromosomie X genie *Atp7a*. Mutacja ta nazwana jest *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) i jest letalna dla samców, które umierają pomiędzy 15, a 17 dniem życia. Samce mutanty *mosaic* wykazują cały szereg objawów chorobowych charakterystycznych dla ogólnoustrojowego niedoboru miedzi. Mutanty te są uznawane za zwierzęcy model choroby Menkesa. Choroba Menkesa wywołana jest mutacją w genie *ATP7A*, który u człowieka również zlokalizowany jest w obrębie chromosomu X. U pacjentów brak aktywności białka ATP7A prowadzi do akumulacji miedzi w ścianach jelita cienkiego, a także w obrębie nerek. W konsekwencji zjawisko to prowadzi do ogólnoustrojowego niedoboru w organizmie pacjentów, a także do silnego uszkodzenia nerek. Choroba ta jest nieuleczalna i prowadzi do śmierci w wieku wczesnodziecięcym. Zarówno u pacjentów z chorobą Menkesa, jak i u myszy mutantów *mosaic* stosuje się terapeutyczne podanie związków miedzi z pominięciem bariery jelitowej. U myszy stosowana terapia redukuje objawy chorobowe i znosi letalne skutki mutacji, jednak u ludzi patologiczne objawy są zredukowane jedynie częściowo, a stosowana terapia prowadzi do wydłużenia życia pacjentów. Terapeutyczne podawanie związków miedzi u ludzi, jak i u myszy wywołuje jednak skutki uboczne, związane z silnym uszkodzeniem nerek spowodowanym gromadzeniem się nadmiaru tego pierwiastka w komórkach kanalików nerkowych.

U ssaków wątroba jest głównym organem odpowiedzialnym za utrzymanie prawidłowej homeostazy miedzi i dzięki niej nadmiar tego pierwiastka jest usuwany z organizmu. Natomiast w nerkach jony miedzi przesączone są w procesie filtracji do moczu

pierwotnego, a następnie są ponownie zreabsorbowane do krwioobiegu. Procesy reabsorpcji jonów miedzi z przesączu pierwotnego zachodzą w obrębie kanalików nerkowych przy udziale białka CTR1, a następnie są one transportowane z komórek kanalików do krwioobiegu przy udziale białka ATP7A. Brak aktywności białka ATP7A prowadzi do akumulacji miedzi w komórkach kanalików nerkowych i silnego efektu nefrotoksycznego zarówno u pacjentów z chorobą Menkesa, jak i u myszy mutantów *mosaic*.

Badania prowadzone w obecnej pracy z wykorzystaniem myszy z mutacją w genie *Atp7a*, jak również z uwzględnieniem wpływu stosowania u tych zwierząt terapii chlorkiem miedzi (II), obejmowały analizę ekspresji genów i białek biorących udział w procesie reabsorpcji jonów miedzi przez komórki kanalików nerkowych. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że pod wpływem zmian zawartości miedzi w nerkach, a także pod wpływem stosowanej iniekcji CuCl_2 , dochodzi do zmian w ekspresji genów *Ctr1* oraz *Ctr2*. Metodą analizy immunofluorescencyjnej wykazano, że pod wpływem zmian zawartości miedzi w nerkach u samców mutantów *mosaic*, a także pod wpływem stosowanej iniekcji CuCl_2 u osobników o genotypie dzikim, białko CTR1 w komórkach kanalików nerkowych zostaje usunięte z błony apikalnej i ulega relokalizacji do cytoplazmy, natomiast długotrwałe działanie wysokiego stężenia miedzi powoduje jego degradację. Jest to mechanizm, który ogranicza pobieranie jonów miedzi przez komórki, a tym samym chroni komórki nefronów przed cytotoksycznym działaniem miedzi. W obecnej pracy wykazano również, że wewnątrzkomórkowa lokalizacja białka CTR1 w obrębie komórek nerek mutantów *mosaic* różni się od tej obserwowanej u osobników o genotypie dzikim. Badania prowadzone w obecnej pracy obejmowały również analizę ekspresji genów i białek metalochaperonów, ATOX1 oraz CCS. Białko ATOX1 wiąże jony miedzi w cytoplazmie i transportuje je do aparatu Golgiego, gdzie następnie są one przyłączane do cząsteczek ATPaz, ATP7A i ATP7B. W warunkach wysokiego stężenia miedzi w komórce ATOX1 może być transportowane do jądra komórkowego, gdzie pełni rolę czynnika transkrypcyjnego dla genu kodującego cyklinę D1, białka regulującego tempo podziałów komórkowych. Wyniki uzyskane w obecnej pracy wykazały, że w nerkach samców mutantów *mosaic* białko ATOX1 zlokalizowane było jedynie w obrębie cytoplazmy komórek kanalików nerkowych, co wskazuje, że pełni ono w tych komórkach tylko funkcję metalochaperonu. Wyniki te wskazują również, że obserwowana nadmierna proliferacja komórek w nerkach samców mutantów *mosaic* zachodzi najprawdopodobniej na innej drodze niż aktywacja ekspresji cykliny D1 przez czynnik transkrypcyjny ATOX1. Białko CCS dostarcza jony miedzi i pośredniczy w ich włączaniu do cząsteczek dysmutazy ponadtlenkowej SOD1, jak również

uczestniczy w aktywacji tego enzymu. Białko SOD1 jest odpowiedzialne za ochronę komórek przed negatywnym działaniem stresu oksydacyjnego. Ekspresja białka CCS jest regulowana poprzez stężenie jonów miedzi. Obniżenie poziomu zawartości tego pierwiastka prowadzi do podwyższenia poziomu ekspresji białka CCS, natomiast wzrost poziomu zawartości miedzi skutkuje znacznym obniżeniem ekspresji tego białka. Jak wykazano w obecnej pracy, w nerkach samców mutantów *mosaic* akumulacja miedzi prowadzi do obniżenia ekspresji białka CCS, co z kolei skutkuje spadkiem aktywności enzymu SOD1. Tym samym wykazano, że w nerkach samców mutantów *mosaic* zmniejsza się poziom ochrony antyoksydacyjnej, co również może być przyczyną patologicznych zmian w budowie oraz funkcji nerek u samców mutantów *mosaic*.

Przedstawione w obecnej pracy wyniki po raz pierwszy wykazały, że w wyniku zmian w poziomie zawartości miedzi w nerkach, wywołanych zaburzonym transportem jonów miedzi, a także stosowaniem suplementacji chlorkiem miedzi (II), w komórkach kanalików nerkowych dochodzi do utworzenia specyficznych i kompleksowych mechanizmów, których celem jest ochrona komórek przed działaniem wysokiego stężenia jonów miedzi.

2. Abstract

Copper is a microelement essential for the proper functioning of the organism, due to its redox ability it plays role of a cofactor for many enzymatic proteins. Both, copper excess and its deficiency, lead to pathological conditions, therefore living organisms developed precise control of copper transport and metabolism. In mammalian cells, there are three main groups of proteins involved in the maintenance of copper homeostasis. The first group are the membrane transporters CTR1 and CTR2, by which cells absorb copper ions. Second group are cytoplasmic copper ions transporters, metallochaperones ATOX1, CCS and COX17. Third group consists of the ATPases located in the trans Golgi network, ATP7A and ATP7B, proteins that mediate in copper delivery to the apo-enzymes and regulate cytoplasmic copper level within the cells.

In the present study are presented expression results of the copper membrane transporters (CTR1 and CTR2) and selected metallochaperones, in the organs of mice with copper metabolism disturbances caused by mutation in the *Atp7a* gene, which is located on the X chromosome. This mutation is called *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) and is lethal for male mice, which die between 15 and 17 days after birth. *Mosaic* mutant mice display whole range of disease symptoms, which are characteristic for copper deficiency. These mutants are an established animal model of Menkes disease. Menkes disease is caused by mutation in the *ATP7A* gene, which in human also is localized on the X chromosome. In Menkes patients lack of ATP7A protein activity leads to copper accumulation in the small intestine cells and in kidneys. In consequence, it leads to systemic copper deficiency and severe kidney damage. This disease is incurable and leads to death in the early childhood. In both, patients with Menkes disease and *mosaic* mutant mice, is used therapy with parenteral supplementation of copper compounds. In *mosaic* mutant mice which undergone copper therapy, lethal effect and pathological symptoms of the *Atp7a* gene mutation are reduced, however in Menkes patients used therapy leads to partially reduction of pathological symptoms and to prolongation of their lives. However, in patients and in *mosaic* mutant mice, therapeutic administration of copper compounds induces side effects associated with severe kidney damage, caused by copper accumulation in renal epithelial cells.

In mammals, liver is a main organ responsible for copper homeostasis and removing copper excess from body. In kidneys, copper ions are filtered during filtration process, to the urine and then reabsorbed to the circulation. Reabsorption of copper ions occurs in renal tubules with participation of CTR1 protein and then transferred back to the blood via ATP7A protein. Lack of ATP7A protein activity leads to copper accumulation in renal tubules and to

the strong nephrotoxic effects in patients with Menkes disease and also in *mosaic* mutant mice.

Studies performed on mice with mutation in gene *Atp7a* with included effects of copper therapy, presented results of expression analysis on the genes and proteins involved in copper ions reabsorption in renal tubule cells. Performed results showed that under the influence of copper content changes and also under the CuCl₂ injections, in kidneys, changes of the *Ctrl* and *Ctrl2* genes expression occur. Method of immunofluorescence analysis showed that under the influence of copper content changes in *mosaic* mutant mice kidneys and also under the CuCl₂ injections in wild type mice, CTR1 protein in renal tubule cells is removed from the apical membrane and transported to the cytoplasm, where long-lasting high copper concentration causes degradation of this protein. This is a mechanism that limits the copper uptake by the cells and thus protects the nephron cells against the cytotoxic effects of copper. In the present work has been shown, that intracellular localization of CTR1 protein within kidney cells of *mosaic* mutant mice differs from that protein localization observed in wild type mice. Research performed in the present work included analysis of *Atox1*/ATOX1 and *Ccs*/CCS genes and proteins expression. In the cells, ATOX1 protein binds copper ions in the cytoplasm and transports to the trans Golgi network, where transfers them to the ATP7A and ATP7B proteins. In cells, during high copper concentration, ATOX1 is transported to the cell nucleus, where it acts as a transcription factor for gene coding cyclin D1, a protein that regulates cells division. Obtained findings indicate that in *mosaic* mutant mice kidneys, ATOX1 protein was only localized within the cytoplasm of the renal tubule cells, what indicates that this protein performs in these cells only role of the metallochaperone. These results also indicate that observed excessive cell proliferation in *mosaic* mutant mice kidneys is most likely activated in a different way than by the ATOX1 transcription factor. CCS protein provides copper ions and mediates their incorporation into SOD1 protein, also it participates in the activation of this enzyme. The SOD1 protein is responsible for protecting cells from the negative effects of oxidative stress. The expression of CCS protein is regulated by the copper concentration. Low level of copper concentration increases CCS protein expression, while increased copper concentration results in a significant reduction of CCS protein expression. In the present work it is shown, that in *mosaic* mutant mice kidneys, accumulation of copper leads to decrease in the CCS protein expression, what results in a decreased activity of the SOD1 enzyme. Thus, it has been presented, that in *mosaic* mutant mice kidneys the level of antioxidant protection is reduced, what may also cause the pathological changes in kidney structure and function in *mosaic* male mutants.

Presented results, for the first time, showed that changes in the copper concentration in kidneys, caused by disturbed copper transport and also caused by copper supplementation, induce the formation of the specific and comprehensive mechanisms in renal tubules cells, which protect those cells from the high copper concentration.

3. Wstęp

Choroba Menkesa jest to stosunkowo rzadka choroba genetyczna, która występuje z częstotliwością 1:140 000 - 1:300 000 żywych urodzeń, przy czym dane te są zmienne w zależności od populacji (Gu i wsp. 2005, Tonnesen i wsp. 1991, Tumer i Moller 2010). Jest ona ciężkim syndromem metabolicznym związanym z zaburzeniami metabolizmu miedzi. Bliższa charakterystyka przyczyn tej choroby oraz jej przebieg będzie przedstawiona w dalszej części tego rozdziału.

3. 1. Rola miedzi w organizmie ssaków

Miedź jest pierwiastkiem chemicznym, który w organizmie człowieka występuje w śladowych ilościach. Obok żelaza i cynku jest ona jednym z najczęściej występującym w diecie człowieka mikroelementem niezbędnym do jego prawidłowego funkcjonowania (Murray i wsp. 1995, Prohaska 1997).

Miedź może występować w formie zredukowanej (Cu^+), jak również w formie utlenionej (Cu^{2+}). Ze względu na swoje silne właściwości oksydoredukcyjne pełni ona rolę kofaktora i jest wbudowywana w centra aktywne wielu białek enzymatycznych biorących udział w podstawowych i jednocześnie kluczowych procesach metabolicznych. Wśród tych procesów należy wymienić oddychanie komórkowe (oksydaza cytochromu c; CCO; ang. *cytochrome c oxidase*), syntezę neuroprzekaźników (β -hydroksylaza dopaminy; DBH; ang. *dopamine β -hydroxylase*), modyfikacje hormonów peptydowych (monooksygenaza α -amidująca peptydyloglicyny; PAM; ang. *peptidyl α -amidating monooxygenase*), usuwanie wolnych rodników (dysmutaza ponadtlenkowa SOD1; ang. *superoxide dismutase Cu-Zn 1* oraz SOD3; ang. *extracellular superoxide dismutase Cu-Zn*), tworzenie wiązań poprzecznych w kolagenie i elastynie (oksydaza lizylowa; LOX; ang. *lysyl oxidase*), syntezę keratyny (oksydaza sulfhydrylowa; SOX; ang. *sulfhydryl oxidase*), syntezę melaniny (tyrozynaza; TYR; ang. *tyrosinase*), a także utrzymanie prawidłowej homeostazy żelaza (ceruloplazmina; CP; ang. *ceruloplasmin* i hefajstyna; ang. *hephaestin*) (Lutsenko i wsp. 2007, Petris i wsp. 2000, Steveson i wsp. 2003, Van den Berghe i Klomp 2010, Veldhuis i wsp. 2009).

Niedobór miedzi w organizmie prowadzi między innymi do zaburzeń w przyswajaniu żelaza, formowaniu tkanki łącznej, nieprawidłowości w strukturze naczyń krwionośnych, depigmentacji, ale także wiąże się z postępującym procesem neurodegeneracji, czy zaburzeń w szlakach syntezy neurotransmiterów (Huster i Lutsenko 2007, Lutsenko i wsp. 2007, Tumer i Moller 2010). Również jej nadmiar jest dla organizmu bardzo toksyczny, gdyż

miedź, jako pierwiastek o silnych właściwościach oksydoredukcyjnych, bierze udział w reakcji Fentona, podczas której nadtlenek wodoru, przy udziale jonów Cu^+ , przekształcany jest w wolne rodniki hydroksylowe (OH^\bullet), a proces ten zachodzi zgodnie z reakcją:



Rodniki te należą do jednych z najbardziej reaktywnych form tlenu (ROS; ang. *reactive oxygen species*) i są one niezwykle szkodliwe, gdyż ich działanie prowadzi do uszkodzeń struktur komórkowych, takich jak kwasy nukleinowe, białka oraz lipidy (Bartosz 2009). Dlatego też zarówno niedobór, jak i nadmiar miedzi prowadzi do bardzo ciężkich schorzeń metabolicznych. Do dwóch ciężkich syndromów związanych z zaburzeniami metabolizmu miedzi należą wspomniana wcześniej choroba Menkesa, a także choroba Wilsona (WD; ang. *Wilson disease*) (Huster i Lutsenko 2007, Strausak i wsp. 2001). Zaburzenia metabolizmu miedzi mogą przyczynić się również do powstania chorób na tle neurologicznym i neurodegeneracyjnym, takich jak choroba Alzheimer, choroba Parkinsona, choroby prionowe czy neuropatia ruchowa (Armendariz i wsp. 2004, Huster i Lutsenko 2007, Montes i wsp. 2014, Varela-Nallar i wsp. 2006).

3. 2. Wchłanianie i transport miedzi w organizmie ssaków

Miedź jest niezbędna nie tylko dla prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych zachodzących w trakcie życia postnatalnego, ale również jest niezwykle istotna dla rozwoju płodu. W życiu płodowym u ssaków miedź dostarczana wraz z krwią matki transportowana jest przez łożysko do płodu i magazynowana jest w wątrobie (Hardman i wsp. 2007). Zgromadzone w tym okresie zapasy miedzi będą wykorzystywane już w początkowym okresie życia postnatalnego na potrzeby rosnącego i rozwijającego się organizmu (Chun i wsp. 2017, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2014, Lenartowicz i wsp. 2017). Co prawda u ssaków w okresie laktacji miedź wydzielana jest wraz z mlekiem matki i dostarczana do organizmu osesków, jednak jej zawartość w mleku jest stosunkowo niska i oseski wykorzystują zapasy tego pierwiastka zgromadzone w wątrobie (Michalczyk i wsp. 2008).

W przypadku dorosłych osobników miedź jest przyjmowana wraz z pokarmem. U człowieka dzienna zalecana dawka (RDA; ang. *recommended daily allowance*) tego pierwiastka mieści się w zakresie 0,9-1,35 mg (Sadhra i wsp. 2007, Trumbo i wsp. 2001). Tylko około 15% miedzi zaabsorbowanej z pokarmu zużywane jest na potrzeby metabolizmu

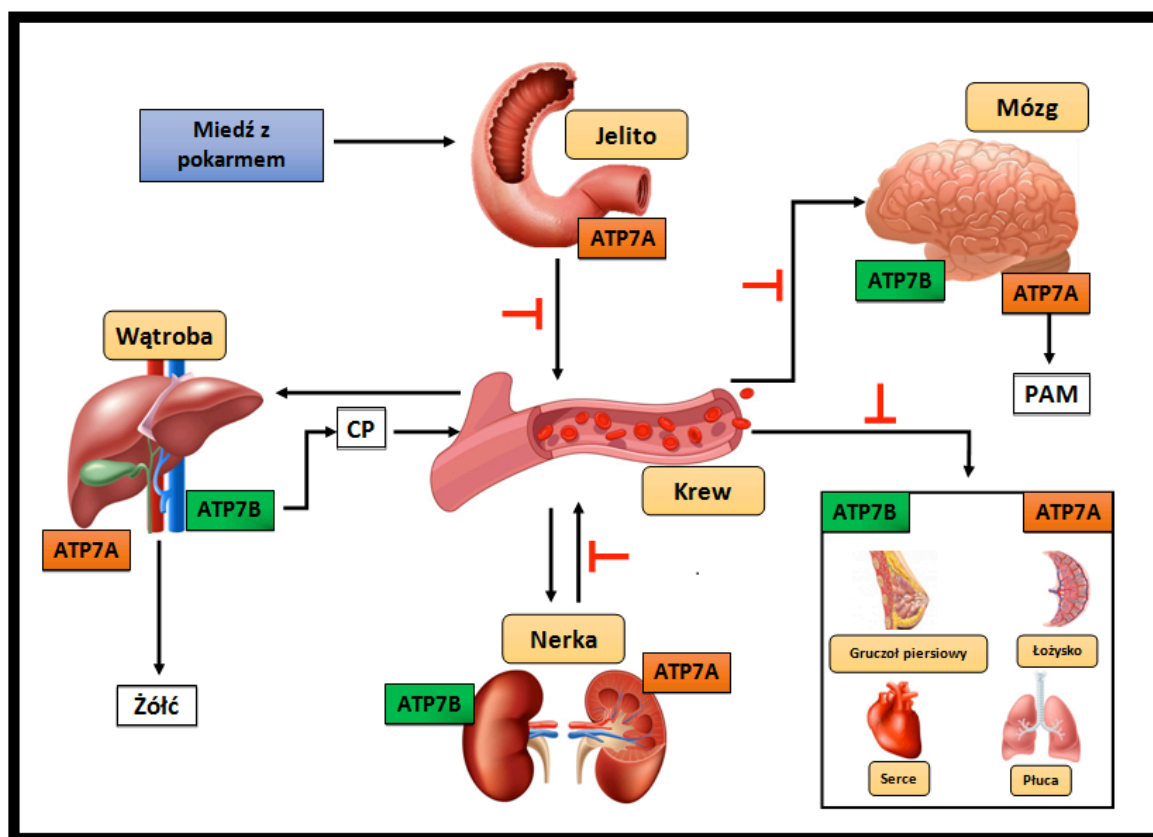
i rozwoju organizmu, natomiast nadmiar miedzi zostaje z niego wydalony (Wijmenga i Klomp 2004). Miedź wchłaniana jest głównie przez wyspecjalizowane komórki nabłonkowe początkowego odcinka jelita cienkiego – enterocyty dwunastnicy, skąd trafia do krwioobiegu. W treści pokarmowej miedź występuje głównie w formie utlenionej (Cu^{2+}), dlatego pobieranie tego pierwiastka przez enterocyty poprzedzone jest procesem redukcji. Najprawdopodobniej za ten proces odpowiadają białka z rodziny STEAP (ang. *six-transmembrane epithelial antigen of the prostate*) oraz białko CYBRD1 (ang. *cytochrome b reductase 1*), które są reduktazami powierzchniowymi zlokalizowanymi na komórkach jelita (Collins i wsp. 2010, Knopfel i Solioz 2002, Ohgami i wsp. 2006). Za transport zredukowanych jonów Cu^+ przez błonę komórkową do cytoplazmy enterocytów odpowiada głównie białko CTR1 (ang. *copper transporter 1*). Wyniki licznych badań wskazują również, że w mniejszym stopniu w tym procesie bierze również udział białko DMT1 (ang. *divalent metal transporter 1*), które odpowiada głównie za transport jonów Fe^{2+} . Białko to może transportować miedź do wnętrza komórki w formie utlenionej Cu^{2+} (Dancis i wsp. 1994, Kaler 2011, Klomp i wsp. 2002, Kuo 2006, Lutsenko, 2007, Nose i wsp. 2006, Van den Berghe i Klomp, 2010). Z komórek jelita miedź transportowana jest do krwioobiegu przy udziale białka ATP7A. Pierwiastek ten w surowicy krwi zostaje przyłączony do białek, peptydów i aminokwasów, takich jak albumina, transkupreina, α_2 -makroglobulina, glutation, czy histydyna (Di Donato i Sarkar 1997, Linder i wsp. 1998, Lutsenko i wsp. 2007, Ravia i wsp. 2005).

Wraz z krwią miedź żyłą wrotną trafia do wątroby – organ ten pełni nadrzędną rolę w kontroli metabolizmu tego pierwiastka w organizmie (Lenartowicz i wsp. 2010a, Wijmenga i Klomp 2004). W wątrobie zachodzi synteza takich białek jak ceruloplazmina oraz metalotioneina wiążących kationy miedzi. W połączeniu z ceruloplazminą miedź powtórnie wydzielana jest do krwioobiegu. Kompleks ten stanowi 65–70% miedzi w osoczu i pełni rolę głównego czynnika utrzymującego homeostazę tego pierwiastka w organizmie (Di Donato i Sarkar 1997, Hellman i wsp. 2002, Wijmenga i Klomp, 2004). Wątroba jest również organem odpowiedzialnym za usuwanie nadmiaru miedzi z organizmu. Miedź z komórek hepatocytów transportowana jest do syntetyzowanej w wątrobie żółci, która z kolei wydzielana jest do przewodu pokarmowego, a następnie wydalana wraz z kałem. Dzięki temu z organizmu usuwane jest aż 98% tego metalu (Di Donato i Sarkar 1997, Wijmenga i Klomp 2004).

Wraz z krwią miedź trafia do wszystkich organów w tym również do mózgu. Jak wykazały wyniki licznych badań miedź pełni bardzo ważną rolę w rozwoju i prawidłowym funkcjonowaniu ośrodkowego systemu nerwowego zarówno u człowieka, jak i u zwierząt

(Choi i Zheng 2009, El Meskini i wsp. 2003, Niciu i wsp. 2006). W porównaniu do innych tkanek organizmu, mózg, zaraz po wątrobie, zawiera największe ilości tego metalu (Lech i Sadlik 2007). Wysoki poziom miedzi w mózgu związany jest z aktywnością metaboliczną miedziozależnych enzymów związanych z rozwojem komórek nerwowych oraz procesami synaptogenezy (El Meskini i wsp. 2003). Do tych enzymów zaliczane są przede wszystkim oksydaza cytochromu c, monooksydaza α -amidująca peptydyloglicyny, czy też monooksydaza β -dopaminy (El Meskini i wsp. 2003, Klinman 2006, Steveson i wsp. 2003). Miedź transportowana jest do mózgu wraz z krwią, gdzie dociera do dwóch barier oddzielających mózg od dostarczanej z pozostałych części organizmu krwi - bariery krew-mózg (BBB; ang. *blood-brain barrier*) oraz bariery krew-płyn mózgowordzeniowy (BCB; ang. *blood-cerebrospinal fluid barrier*). Mechanizm transportu tego pierwiastka przez wymienione bariery nie jest do końca poznany. Wiadomo, że w warunkach fizjologicznych transport jonów miedzi, do mózgu wymaga wyspecjalizowanych transporterów. Jony miedzi dostarczane są do wnętrza komórek tworzących bariery BBB oraz BCB przy udziale błonowych białek CTR1 oraz DMT1, natomiast ich wydzielanie do płynu mózgowordzeniowego zachodzi za pomocą białek ATP7A i ATP7B. Wszelkie nieprawidłowości w transporcie miedzi mają ogromny wpływ na prawidłowy rozwój oraz działanie ośrodkowego systemu nerwowego, co w konsekwencji prowadzi do chorób o podłożu neurodegeneracyjnym (Choi i Zheng 2009, Niciu i wsp. 2006).

Wraz z krwią miedź trafia również do nerek. W warunkach fizjologicznych jony miedzi przesączane są w procesie filtracji kłębuszkowej do moczu pierwotnego w obrębie kłębuszka nerkowego, aby następnie mogły być ponownie zreabsorbowane do krwioobiegu. Proces reabsorpcji tego pierwiastka z moczu pierwotnego zachodzi w komórkach kanalików proksymalnych. W komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych wykryto białka umożliwiające probiernie jonów miedzi z moczu pierwotnego, ich transport w obrębie komórek, a także ich transport z komórek kanalików do krwioobiegu. Proces reabsorpcji zachodzi z dużą wydajnością i tylko 2% miedzi usuwane jest z organizmu wraz z moczem (Linz i Lutsenko 2007, Wijmenga i Klomp 2004). Rycina 1 przedstawia transport miedzi w organizmie człowieka w warunkach fizjologicznych, a także zaburzenia tego transportu w warunkach patologicznych, jakie obserwuje się u pacjentów z chorobą Menkesa (Ryc. 1).



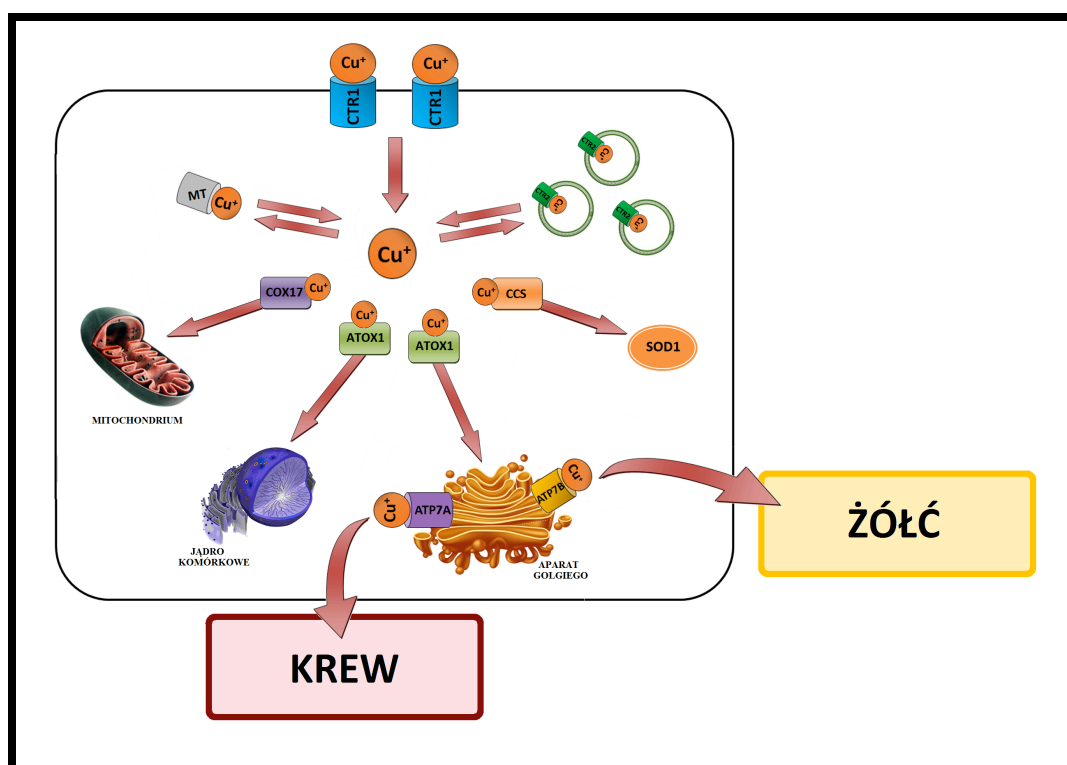
Ryc. 1. Schemat przedstawiający wchłanianie i transport miedzi w organizmie. Miedź wchłaniana jest z pokarmu w jelicie cienkim głównie za pomocą białka CTR1. Następnie przy udziale białka ATP7A dostarczana jest do naczyń krwionośnych, gdzie wraz z krwią transportowana jest do wszystkich tkanek organizmu. Na schemacie zaznaczono miejsca (czerwone znaki T), gdzie u pacjentów z chorobą Menkesa w wyniku braku prawidłowo funkcjonującego białka ATP7A transport miedzi jest zaburzony.

3. 3. Transport miedzi na poziomie komórki

Ze względu na wysoką reaktywność jony miedzi w komórce nie mogą występować w stanie wolnym, ale muszą być związane z odpowiednimi białkami lub aminokwasami (O'Halloran i Culotta 2000). Potwierdzają to badania przeprowadzone na komórkach drożdży. Analizując zawartość wolnej miedzi w komórkach tych organizmów wykazano, że na pojedynczą komórkę przypada mniej niż jeden wolny atom tego metalu (O'Halloran i Culotta 2000, Rae i wsp. 1999). W celu ochrony komórek oraz tkanek organizmu przed toksycznym działaniem wysokiego stężenia jonów miedzi, a także zapewnieniem odpowiedniej ilości tego pierwiastka dla prawidłowego metabolizmu komórek, organizmy, zarówno jednokomórkowe, jak i wielokomórkowe wykształciły bardzo precyzyjne i podlegające kontroli genetycznej mechanizmy, których zadaniem jest utrzymanie prawidłowej homeostazy jonów miedzi na

poziomie każdej żywej komórki (Lutsenko i wsp. 2007, O'Halloran i Culotta 2000, Prohaska i Gybina 2004).

W komórkach ssaków za transport i prawidłowy metabolizm miedzi odpowiedzialne są trzy główne grupy białek. Pierwszą z nich stanowią transportery błonowe, które są niezbędne dla pobierania jonów miedzi przez komórki. Do tej grupy zaliczane są białka należące do rodziny CTR, takie jak CTR1 i CTR2 (ang. *copper transporter 2*) oraz w dużo mniejszym stopniu DMT1. Drugą grupę stanowią białka chaperonowe (metalochaperony), które wiążą i transportują jony miedzi w obrębie cytoplazmy. Ostatnią grupę tworzą białka o strukturze ATPaz – białko ATP7A i ATP7B, które zlokalizowane są w błonach aparatu Golgiego. Białka te są odpowiedzialne za wbudowywanie miedzi do cząsteczek miedziozależnych enzymów podlegających obróbce potranslacyjnej w obrębie tej struktury oraz uczestniczą w usuwaniu nadmiaru miedzi z komórki (La Fontaine i Mercer 2007, Lutsenko i wsp. 2007, Veldhuis i wsp. 2009). Transport miedzi w obrębie komórki został schematycznie przedstawiony na rycinie 2 (Ryc. 2).



Ryc. 2. Transport miedzi na poziomie komórkowym. Zredukowane jony miedzi są transportowane przez błonę komórkową przy udziale transportera błonowego CTR1, a następnie przekazywane białkom chaperonowym. Białka te transportują jony miedzi do mitochondrium (COX17), dysmutazy nadtlenkowej 1 (CCS), jądra komórkowego (ATOX1), czy też przekazują je ATPazom, ATP7A i ATP7B (ATOX1) zlokalizowanym w

blonach aparatu Golgiego. ATPazy włączają jony miedzi do nieaktywnych apoenzymów, takich jak tyrozynaza, oksydaza lizylova czy ceruloplazmina, które po przyjęciu jonów metalu zostają zamienione w funkcjonalne holoenzymy. W przypadku, gdy poziom miedzi w komórkach przekracza próg fizjologiczny białko ATP7A usuwa nadmiar tego pierwiastka z komórki. W komórkach spolaryzowanych białko ATP7A transportowane jest do błony bazolateralnej, natomiast białko ATP7B do błony apikalnej (w hepatocytach białko ATP7B transportuje jony miedzi do żółci). Białko CTR2 zlokalizowane jest głównie w cytoplazmie, gdzie wiąże jony miedzi w obrębie pęcherzyków cytoplazmatycznych. Komórkowym rezerwuarem jonów miedzi jest białko metalotioneina (MT) zlokalizowane również w obrębie cytoplazmy.

3. 4. Charakterystyka białek transportujących jony miedzi w obrębie komórki

Utrzymanie prawidłowej homeostazy miedzi zależy od wielu procesów, do których zaliczane są procesy wchłaniania jednowartościowych kationów metalu, ich wewnątrzkomórkowego magazynowania oraz transport w obrębie komórki. W dalszych rozdziałach obecnej pracy scharakteryzowane zostaną poszczególne grupy białek, do których zaliczane są transportery należące do rodziny CTR1 (białko CTR1 oraz CTR2), a także metalochaperony ATOX1 (ang. *antioxidant protein 1*), CCS (ang. *copper chaperone for superoxide dismutase*) oraz COX17 (ang. *cytochrome c oxidase copper chaperone*). Białka te biorą udział w procesach kontrolujących prawidłowe wewnątrzkomórkowe stężenie miedzi.

3. 4. 1. Białko CTR1 – główny błonowy transporter jonów miedzi

Zredukowana miedź jest pobierana przez komórkę przy udziale białek z rodziny CTR, znanych również jako białka rodziny SLC31 (ang. *solute carrier family*). Jak wykazały badania, około 80% miedzi transportowane jest do wnętrza komórek ssaków przy udziale głównego transportera jonów miedzi, białka CTR1 (Larson i wsp. 2010). Jest ono oligomerem, które w swej aktywnej formie pozostaje wbudowane w błonę komórki. Transport jonów miedzi z udziałem tego białka nie wymaga nakładów energetycznych pozyskiwanych z hydrolizy cząstki ATP, a opiera się on na konformacyjnych zmianach białka oraz na oddziaływaniu ładunków elektrostatycznych utworzonych przez reszty aminokwasów (Ohrvik i Thiele 2015).

Pierwsze geny, kodujące białko z rodziny CTR1 zostały odkryte i opisane u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (*yCtr1* oraz *yCtr2*) (Dancis i wsp. 1994, Kampfenkel i wsp. 1995, Knight i wsp. 1996). U człowieka gen kodujący białko CTR1 (*hCTR1*, *SLC31A1*) znaleziono

w obrębie długiego ramienia chromosomu 9, gdzie zlokalizowany jest w pozycji 9q32 i składa się z 5 egzonów (Zhou i Gitschier 1997). Natomiast u myszy gen *mCtrl* (*Slc31a1*) zlokalizowany jest w obrębie chromosomu 4 w pozycji 4C1-2 i obejmuje 6 egzonów (Lee i wsp. 2000).

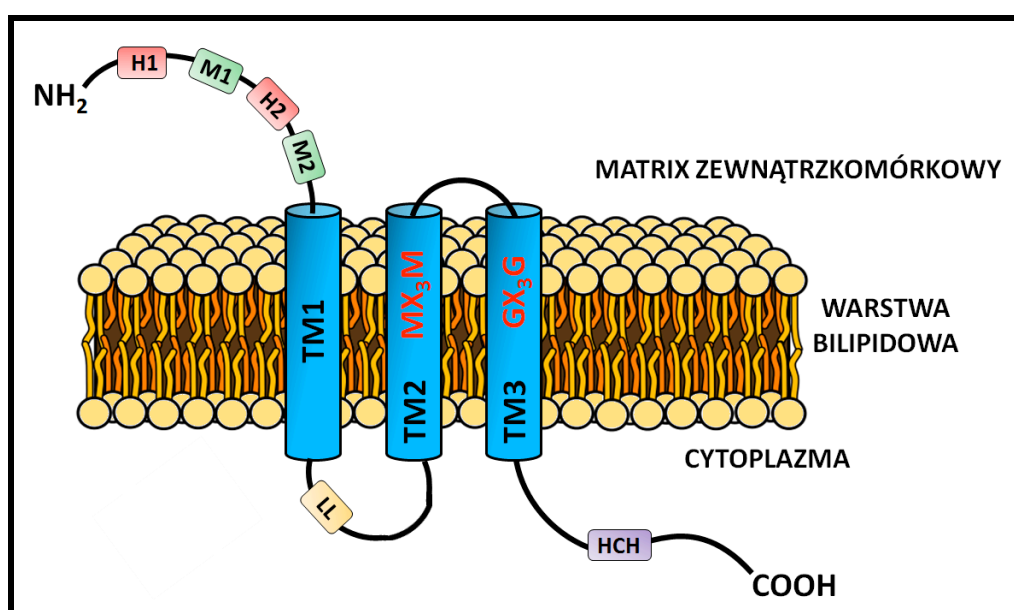
Zarówno ludzki, jak i mysi gen *CTR1/Ctrl* wykazuje wysoką ekspresję w takich narządach jak wątroba, trzustka, serce, nerki, jajniki, jądra, a także w tkance łącznej gałki ocznej (Kuo i wsp. 2006). Z kolei w płucach oraz mięśniach szkieletowych poziom jego ekspresji jest stosunkowo niski (Gupta i Lutsenko 2009, Kuo i wsp. 2006, Zhou i Gitschier 1997). U myszy ekspresja genu *mCtrl* wykrywalna jest już na etapie życia płodowego, poczynając od 7 dnia życia zarodka (E7). Brak ekspresji genu *mCtrl* u myszy prowadzi do zamierania zarodków w 9 dniu życia prenatalnego (Kuo i wsp. 2001, Lee i wsp. 2001).

Białko CTR1 wbudowane jest w błonę komórkową, a jego budowa umożliwia wiązanie i transport kationów miedzi. Monomer CTR1 składa się ze 190 aminokwasów o łącznej masie cząsteczkowej 35 kDa, a w swojej strukturze zawiera sześć domen niezbędnych dla prawidłowego transportu kationów miedzi: domenę N-kończową, trzy domeny transmembranowe TMD (ang. *transmembrane domain*), domenę cytoplazmatyczną łączącą pierwszą i drugą domenę transmembranową oraz domenę C-kończową (Ohrvik i Thiele 2015). Schematycznie budowę monomeru białka CTR1 przedstawiono na rycinie 3 (Ryc. 3).

Białko CTR1 zawiera zewnątrzkomórkową domenę N-kończową bogatą w pogrupowane w postaci klastrów reszty metioninowe (MGMSYM oraz MMMMPM) i histydynowe (HSHH oraz HHH), tworzące tak zwane motywy Mets (ang. *Mets motifs*), odpowiedzialne za przyłączanie zredukowanych jonów miedzi Cu^+ (De Feo i wsp. 2007, Dumay i wsp. 2006, Larson i wsp. 2010, Ohrvik i wsp. 2013, Petris 2004, Puig i wsp. 2002). Domena N-kończowa przechodzi w pierwszą z domen transmembranowych TMD1, która nie zawiera charakterystycznych, wysoce konserwatywnych motywów aminokwasowych potrzebnych dla transportu jonów miedzi, ale bierze udział w stabilizacji białka CTR1 w obrębie błony. Domena TMD1 połączona jest pętlą cytoplazmatyczną z drugą transmembranową domeną TMD2. Druga domena transmembranowa zawiera bogaty w metioninę klaster MxxxM, który jest kluczowy dla aktywności białka CTR1 jako transportera jonów miedzi. Ponadto motyw ten jest niezbędny w procesie endocytozy i degradacji białka CTR1 (Van den Berghe i Klomp 2010). Trzecia transmembranowa domena zawiera konserwatywny motyw GxxxG, który jest związany z procesami umożliwiającymi łączenie się monomerów białka CTR1 w funkcjonalny homotimer (Aller i wsp. 2004, Aller i Unger

2006, De Feo i wsp. 2007, De Feo i wsp. 2009, Petris i wsp. 2003). C-końcowa domena znajduje się w cytoplazmie i zawiera bogaty w histydynę motyw HCH wiążący jony miedzi, co chroni komórkę przed niekontrolowanym wnikaniem jonów miedzi do cytoplazmy (Eisses i Kaplan 2005, Guo i wsp. 2004, Klomp i wsp. 2002).

Białko CTR1 wbudowane jest w błonę komórkową w formie homotrimeru i tylko w takiej formie ma możliwość transportu jonów miedzi przez błonę komórkową. W formowaniu takiej struktury biorą udział interakcje pomiędzy poszczególnymi częściami monomerycznych podjednostek (Aller i wsp. 2004, Aller i Unger 2006, De Feo i wsp. 2007, De Feo i wsp. 2009). Homotrimer CTR1 tworzy w błonie komórkowej charakterystyczną strukturę w postaci lejkowatego poru o średnicy 9Å w swym najwęższym miejscu poszerzającego się w stronę skierowaną do cytoplazmy, umożliwiając ruch jonów Cu^+ do wnętrza komórki (De Feo i wsp. 2009).



Ryc. 3. Schemat budowy monomeru białka CTR1. Na schemacie uwzględniono charakterystyczne domeny białka CTR1, takie jak domena N-końcowa, domena C-końcowa oraz trzy domeny transbłonowe wraz ze znajdującymi się w ich obrębie charakterystycznymi motywami MxxxM oraz GxxxG (Pierzchała i wsp. 2015 – zmodyfikowano).

Białko CTR1 ulega procesom obróbki potranslacyjnej takim jak N- i O-glikozylacja, które zachodzą w obrębie domeny N-końcowej. Dotychczas nie została wyjaśniona funkcja N-glikozylacji, natomiast przypuszcza się, że proces O-glikozylacji jest zaangażowany w

stabilizację struktury i ochronę białka przed niepożądanym działaniem enzymów proteolitycznych (Maryon i wsp. 2007).

Białko CTR1 zlokalizowane jest głównie w błonie komórkowej, gdzie w warunkach fizjologicznych umożliwia pobieranie jonów miedzi przez komórkę. Wzrost stężenia miedzi w obrębie komórki prowadzi do internalizacji białka CTR1, które w pęcherzykach klatrynowych transportowane jest i wbudowywane w błonę wczesnych endosomów i lizosomów (Clifford i wsp. 2016). Dalszy wzrost stężenia kationów miedzi prowadzi do wewnątrzkomórkowej degradacji białka CTR1 (Bauerly i wsp. 2004, Knight i wsp. 1996, Nose i wsp. 2006, Nose i wsp. 2010, Zimnicka i wsp. 2007).

3. 4. 2. Białko CTR2 – transporter jonów miedzi wbudowany w błony endosomów i lizosomów

Białko CTR2 jest kolejnym białkiem z rodziny białek SLC31. Podobnie, jak opisane wcześniej białko CTR1, jest ono transbłonowym transporterem jonów miedzi, jednak o dużo mniejszym powinowactwie do jonów Cu^+ , dlatego też jego udział w pobieraniu jonów miedzi przez komórkę jest znacznie mniejszy (De Feo i wsp. 2007, Dumay i wsp. 2006, Kaplan i Lutsenko 2009, Liu i wsp. 2012, Ohrvik i Thiele 2015, Van den Berghe i wsp. 2007, Van den Berghe i Klomp 2010). Białko CTR2 zlokalizowane jest głównie w obrębie cytoplazmy, gdzie aż 95% tego białka wbudowane jest w błony endosomów i lizosomów. Przyjmuje się, że główna funkcja tego białka związana jest uwalnianiem jonów miedzi, które powstają na skutek rozpadu enzymów zawierających w swej strukturze miedź w obrębie tych organelli. W ten sposób możliwe jest powtórne wykorzystanie kationów miedzi przez komórkę (Rees i wsp. 2004, Van den Berghe i Klomp 2010). Pozostałe 5% białka CTR2 przyjmuje lokalizację w błonie komórkowej (Rees i wsp. 2004).

O ile dane literaturowe dostarczają wiele informacji dotyczących profilu ekspresji genu oraz białka CTR1, o tyle informacje dotyczące genu/białka *CTR2*/*CTR2* są znacznie uboższe. Białko to kodowane jest u człowieka przez zbudowany z 6 egzonów gen *hCTR2* zlokalizowany w obrębie chromosomu 9 w pozycji 9q32 (ncbi.nlm.nih.gov/gene/1318). U myszy gen ten znajduje się na chromosomie 4 w pozycji 4B3 i również zbudowany jest z 6 egzonów (Lee i wsp. 2001, Lee i wsp. 2002, Zhou i Gitschier 1997). Badania przeprowadzone na myszach wskazują, że gen *mCtr2* podlega wysokiej ekspresji w takich organach jak wątroba, nerki, jądra, serce oraz łożysko (Bertinato i wsp. 2008, Ohrvik i Thiele 2015, Zhou i Gitschier 1997).

Białka CTR1 oraz CTR2 na poziomie sekwencji aminokwasów wykazują 33% homologii, a struktura monomeru CTR2 jest podobna do struktury monomeru CTR1. Jednak domena N-końcowa białka CTR2 jest krótsza niż w przypadku białka CTR1 i nie posiada tak charakterystycznych dla białka CTR1 motywów Mets, co najprawdopodobniej jest przyczyną mniejszego powinowactwa białka CTR2 do jonów miedzi (De Feo i wsp. 2007, Dumay i wsp. 2006, Kaplan i Lutsenko 2009, Ohrvik i Thiele 2015, Van den Berghe i Klomp 2010). Stwierdzono również, że jego domena C-końcowa nie posiada motywu HCH charakterystycznego dla białka CTR1. Białko CTR2 posiada jednak charakterystyczne również dla białka CTR1 motywy w obrębie domen transmembranowych TMD2 oraz TMD3. Ponadto w strukturze białka CTR2 występują także dwa motywy dileucynowe (LL). Pierwszy znajduje się w obrębie cytoplazmatycznej pętli pomiędzy domenami transbłonowymi, natomiast drugi na C-końcu, co może sugerować, że motywy te wpływają na silne właściwości internalizacyjne tego białka. W przeciwieństwie do białka CTR1, białko CTR2 nie ulega procesom glikozylacji (Bertinato i wsp. 2008, Gupta i Lutsenko 2009, Kim i wsp. 2009, Ohrvik i Thiele 2015).

3. 4. 3. Białko ATOX1 – cytoplazmatyczny transporter jonów miedzi i czynnik transkrypcyjny

Białko ATOX1 (ang. *antioxidant protein 1*) jest cytoplazmatycznym białkiem, należącym do grupy metalochaperonów, transportującym jony miedzi do ATPazy ATP7A oraz ATP7B, znajdujących się w błonach aparatu Golgiego (Hung i wsp. 1998, Lin i wsp. 1997, Prohaska i Gybina 2004). W ten sposób białko ATOX1 wpływa pośrednio na aktywność wielu miedziozależnych enzymów, które w aparacie Golgiego poddawane są obróbce potranslacyjnej. Białko to oprócz swej podstawowej roli cytoplazmatycznego transportera jonów miedzi może pełnić funkcję antyoksydanta oraz czynnika transkrypcyjnego.

Białko ATOX1 u człowieka kodowane jest przez gen *hATOX1*, który zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 5 w pozycji 5q32 i zbudowany jest z 4 egzonów (Klomp i wsp. 1997, Liu i wsp. 2003). Jego myszy odpowiednik *mAtox1* składa się również z 4 egzonów i zlokalizowany jest w obrębie chromosomu 11 (ncbi.nlm.nih.gov/gene/11927).

U człowieka wysoką ekspresję genu *hATOX1* stwierdzono w wielu organach, między innymi w płucach, nerkach, wątrobie, śledzionie, grasicy, prostaty, jądrach, jajnikach, jelicie cienkim oraz grubym, a także w strukturach centralnego systemu nerwowego (hipokamp,

ciało migdałowate, jądro ogoniaste, ciało modelowate) (Klomp i wsp. 1997). W organizmie myszy bardzo wysoką ekspresję tego genu stwierdzono w nerkach oraz wątrobie (Hamza i wsp. 2000). U myszy *mAtox1* podlega ekspresji w komórkach embrionów od około 12 dnia życia płodu (E12.5). Badania prowadzone na myszach z knockoutem genu *mAtox1* wykazały, że jego ekspresja jest niezbędna dla prawidłowego rozwoju organizmu w okresie życia prenatalnego, a szczególnie we wczesnym okresie postnatalnym. Brak aktywności genu *mAtox1* jest letalny już we wczesnym okresie życia postnatalnego. Część myszy *mAtox1*^{-/-} umierała zaraz po porodzie, a część w okresie, kiedy młode były jeszcze pod opieką matki (około 45% urodzonych zwierząt). Nieliczne osobniki, które przeżyły wczesny okres postnatalny, wykazywały wolniejszy rozwój, a także mniejszą aktywność w porównaniu do zwierząt zdrowych będących w tym samym wieku (Hamza i wsp. 2001). Objawy obserwowane u myszy *mAtox1*^{-/-} są w dużej mierze podobne do tych, które wykazują zwierzęta cierpiące na ostry niedobór miedzi.

ATOX1 jest małym białkiem, które zarówno u ludzi, jak i u myszy zbudowane jest z 68 aminokwasów, o łącznej masie cząsteczkowej 7,4 kDa. Pomiędzy tymi homologami występuje aż 85,3% podobieństwa na poziomie sekwencji aminokwasów (Hamza i wsp. 2000, Hatori i Lutsenko 2013, Klomp i wsp. 1997). Analizy dotyczące struktury tego białka wykazały, że jest ona konserwatywna pomiędzy różnymi gatunkami. Posiada ono charakterystyczną konfigurację utworzoną przez powtarzające się rejony bogate w układy α -helis oraz struktur β -kartki (ang. *$\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -fold structure*). W rejonie tym występuje wysoce konserwatywnych motywów MxCCxxC, dzięki któremu białko ATOX1 poprzez utworzenie wiązań koordynacyjnych przez reszty cystein przylacza pojedynczy jon miedzi. Ponadto motyw ten odpowiedzialny jest za przylaczanie metalochaperonu do odpowiednich domen MBD białek ATP7A oraz ATP7B i przekazanie im jonów miedzi (Itoh i wsp. 2009, Strausak i wsp. 2003, Wernimont i wsp. 2000). Wynika to z faktu, że budowa cytoplazmatycznego transportera, jakim jest białko ATOX1, częściowo pokrywa się z budową N-końcowych domen ATPaz ATP7A i ATP7B. Ma to na celu ułatwienie przekazywania jonów metalu pomiędzy tymi białkami (Achila i wsp. 2006, Banci i wsp. 2005a, Banci i wsp. 2005b, Hatori i Lutsenko 2013, Strausak i wsp. 2003, Walker i wsp. 2002).

W obrębie domeny C-końcowej białka ATOX1 znajduje się kolejny charakterystyczny motyw bogaty w lizynę, region KKTGK. Okazuje się, że jest on sygnałem lokalizacji jądrowej NLS (ang. *nuclear localization sequence*) tego białka. Przeprowadzone badania na mysich embrionalnych fibroblastach (MEFs; *mouse embryonic fibroblasts*) wykazały, że w

przypadku wysokiego stężenia miedzi w obrębie komórki, białko ATOX1 tworzy homodimer, który łączy się z jonami miedzi i przemieszcza się do jądra komórkowego, gdzie w normalnych warunkach występuje w stosunkowo niskim stężeniu (Hatori i Lutsenko 2013, Matson Dzebo i wsp. 2018, Muller i Klomp 2008, Ohrvik i Wittung-Stafshede 2015). Lokalizacja jądrowa białka ATOX1 jest związana z pełnioną przez nie funkcją czynnika transkrypcyjnego (TF; ang. *transcription factor*). Po relokalizacji do jądra komórkowego, przyłącza się ono do charakterystycznej sekwencji GAAAGA w promotorze genu *Ccnd1* kodującego cyklinę D1. Cyklina D1 odpowiedzialna jest za regulację podziałów komórkowych. ATOX1 podnosząc ekspresję genu *Ccnd1* wpływa na wzrost proliferacji komórek (Itoh i wsp. 2008). Kolejnym genem, którego ekspresja jest regulowana przez ATOX1 jest gen kodujący zewnątrzkomórkową dysmutazę ponadtlenkową SOD3. Wysokie wewnątrzkomórkowe stężenie miedzi, poprzez czynnik transkrypcyjny ATOX1, wpływa na wzrost ekspresji genu *Sod3*. Enzym ten syntetyzowany jest w obrębie aparatu Golgiego, a następnie transportowany jest na zewnątrz komórki, gdzie przeciwdziała negatywnemu działaniu stresu oksydacyjnego. Tym samym prawidłowe funkcjonowanie tego enzymu wymaga zbalansowanego działania białka ATOX1 jako chaperonu dostarczającego jony miedzi do enzymu, a także jako czynnika transkrypcyjnego regulującego ekspresję genu (Itoh i wsp. 2009, Jeney i wsp. 2005, Qin i wsp. 2006).

3. 4. 4. Białko CCS – największy z metalochaperonów

Metalochaperon CCS (ang. *copper chaperone for superoxide dismutase*) został po raz pierwszy odkryty i opisany przez V. C. Culotta i współautorów w roku 1997 u drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, następnie opisany i scharakteryzowany został również jego ludzki homolog (Culotta i wsp. 1997). Zarówno u człowieka jak i u drożdży białko CCS jest odpowiedzialne za transport jonów miedzi do białka SOD1, a także za aktywację tego enzymu poprzez bezpośredni kontakt i utworzenie kompleksu pomiędzy tymi białkami (Casareno i wsp. 1998, Culotta i wsp. 1997, Rae i wsp. 1999).

Gen *CCS* u człowieka zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 11 w pozycji 11q13.2 i składa się z 8 egzonów. Z kolei jego odpowiednik u myszy znajduje się na chromosomie 19 w pozycji 4.11 i również zbudowany jest z 8 egzonów (Bartnikas i wsp. 2000). Wysoki poziom ekspresji genu *CCS* stwierdzono w wielu organach, przede wszystkim w wątrobie, nerkach, nadnerczach, płucach, sercu, okrężnicy, a także w strukturach układu nerwowego (mózg, kora, rdzeń kręgowy), natomiast jego niższą

ekspresję opisano w śledzeniu czy trzustce (Rothstein i wsp. 1999). Jak wykazały wyniki eksperymentów przeprowadzonych na myszach z wyłączonym genem *Ccs* (*mCcs*^{-/-}) brak funkcjonalnego białka tego chaperonu nie prowadził do wykształcenia fenotypu patologicznego, ale skutkuje obniżeniem aktywności enzymu SOD1 (Prohaska i wsp. 2003b).

Metalochaperon CCS w swojej dojrzałej formie jest stosunkowo dużym białkiem o wielkości około 35 kDa, zbudowanym z trzech zróżnicowanych funkcjonalnie domen i posiada największą i najbardziej złożoną cząsteczkę spośród poznanych dotychczas metalochaperonów (Bartnikas i wsp. 2000, Palumaa 2013, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004, Wong i wsp. 2000).

Domena I zawiera sekwencję MTCxxC umożliwiającą wiązanie jonów miedzi. Domena II jest wysoce homologiczna do SOD1 i odpowiada za powstanie heterodimeru CCS-SOD1, co ułatwia przekazanie miedzi do białka SOD1. Jony miedzi przekazywane są przez reszty cysteinowe domeny III. W czasie przekazywania jonów miedzi do cząsteczki apoenzymu dochodzi do formowania heterodimeru pomiędzy białkami CCS, a dysmutazą ponadtlennokową (Antinone i wsp. 2017, Lamb i wsp. 1999, Rae i wsp. 2001, Rosenzweig i O'Halloran 2000, Schmidt i wsp. 1999).

Dzięki swej charakterystycznej budowie białko CCS pełni nie tylko rolę transportera jonów Cu do docelowego białka SOD1, ale także jest wymagane dla aktywacji tego enzymu (Bartnikas i wsp. 2000, Palumaa 2013, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004, Wong i wsp. 2000). Aktywacja SOD1 przy udziale CCS poprzedzona jest związaniem jonu miedzi przez motyw CxC zlokalizowany w domenie III metalochaperonu, a następnie jego transportem do docelowego enzymu. Następnym etapem jest połączenie domeny II białka CCS z homologicznym regionem w obrębie struktury białka SOD1. W ten sposób tworzy się kompleks CCS-SOD1 i następuje przekazanie jonów miedzi do białka SOD1. Dzięki temu utworzone zostaje wiązanie dwusiarczkowe pomiędzy cysteiną 57, a cysteiną 244 w obrębie białka SOD1, czego konsekwencją jest utworzenie stabilnego i aktywnego enzymu SOD1 (Antinone i wsp. 2017, Furukawa i O'Halloran 2006, Lamb i wsp. 2001, Leitch i wsp. 2009a, Leitch i wsp. 2009b, Schmidt i wsp. 1999).

Zarówno białko CCS, jak i SOD1 zlokalizowane są głównie w cytoplazmie (Crapo i wsp. 1992). Jak wykazano, oba białka mogą przemieszczać się również do mitochondrium i lokalizować w przestrzeni międzybłonowej (Field i wsp. 2003, Kawamata i Manfredi 2008, Okado-Matsumoto i Fridovich 2001). Wyniki badań przeprowadzone na drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* pokazały, że tylko forma apo-SOD1 może być transportowana

przez błonę mitochondrialną, a w procesie tym bierze udział białko MIA40 (Mesecke i wsp. 2005, Reddehase i wsp. 2009, Varabyova i wsp. 2013).

Dysmutaza ponadtlenkowa SOD1 należy do klasy enzymów, których główną funkcją jest kataliza reakcji dysmutacji anionorodnika nadtlennego do tlenu oraz nadtlenu wodoru. Pierwsze białka należące do tej rodziny zostały odkryte i opisane przez I. Fridovich oraz J. McCord (McCord i Fridovich 1969). Białko to jest jednym z wielu czynników rozbudowanego komórkowego systemu antyoksydacyjnego (Bartosz 2006, Bartosz 2009, Tirzitis i Bartosz 2010). U człowieka gen *SOD1* kodujący dysmutazę ponadtlenną jest zlokalizowany na chromosomie 21 w pozycji 21q22.11, natomiast u myszy na chromosomie 16 w rejonie C3.3 i w obu przypadkach składa się z 5 egzonów (Engidawork i Lubec 2001).

Budowa białka SOD1 jest wysoce konserwatywna ewolucyjnie, co zaobserwowano porównując budowę białek SOD1 organizmów prokariotycznych, jak i eukariotycznych (Bordo i wsp. 1994). U człowieka białko SOD1 w postaci monomeru jest zbudowane z 153 aminokwasów o wielkości około 17 kDa. Tworzy ono homodimer, gdzie każda podjednostka ma charakterystyczną strukturę „ β -baryłki” (ang. *β -barrel*). W takiej postaci każdy z monomerów wiąże zarówno pojedynczy jon miedzi, jak i cynku w obrębie centrum aktywnego białka (Furukawa i O'Halloran 2006, Khare i wsp. 2004).

Dimeryzacja białka SOD1 zależy od środowiska, w którym białko się znajduje, a także od modyfikacji potranslacyjnych, do których zaliczane jest przyłączenie jonów metali Cu i Zn oraz tworzenie wewnątrzcząsteczkowych wiązań dwusiarczkowych (Arnesano i wsp. 2004, Khare i wsp. 2004). W przypadku, gdy białko to jest niestabilnym monomerem, który nie posiada jonów metali często ulega ono agregacji. To zjawisko jest obserwowane w przypadku stwardnienia zanikowego bocznego (ALS; ang. *amyotrophic lateral sclerosis*). Jedną z przyczyn leżących u podłoża tej choroby jest mutacja w genie *SOD1*, a produkowany na matrycy tego genu enzym ma mniejszą stabilność, co sprzyja tworzeniu agregatów w neuronach motorycznych mających silnie negatywne działanie na te komórki (Brotherton i wsp. 2012).

Jak już wcześniej wspomniano, białko SOD1 zlokalizowane jest głównie w cytoplazmie, jednak niewielka ilość tego białka występuje również w przestrzeni międzybłonowej mitochondriom, jak również w lizosomach, peroksisomach, czy jądrze komórkowym (Bartosz 2009, Chang i wsp. 1988, Grzelak i wsp. 2009, Field i wsp. 2003, Lindenau i wsp. 2000, Okado-Matsumoto i Fridovich 2002, Sturtz i wsp. 20010).

W warunkach fizjologicznych w obrębie komórki powstają w sposób naturalny wolne rodniki. Głównym źródłem powstawania anionorodnika ponadtlennego jest

mitochondrialny łańcuch oddechowy, który przekształca około 5% cząsteczkowego tlenu do $O_2^{\bullet-}$. Dysmutaza nadadtlenkowa SOD1 jest jednym z czynników komórkowych biorących udział w walce z negatywnym działaniem stresu oksydacyjnego, który występuje w sytuacji, gdy stężenie ROS przekroczy stężenie fizjologiczne. Jest to miedziozależne białko, które podczas reakcji dysproporcjonowania zamienia wolne rodniki anionorodników nadadtlenkowych na cząsteczki tlenu oraz nadtlenu wodoru (Furukawa i O'Halloran 2006, McCord i Fridovich 1969).

3. 4. 5. Białko COX17 – metalochaperon transportujący jony miedzi do mitochondrium

Metalochaperon COX17 jest zlokalizowany w cytoplazmie, gdzie odbiera jony miedzi od transportera błonowego CTR1 i transportuje je do mitochondrium. W obrębie komórki białko to jest zlokalizowane w cytoplazmie (40% komórkowej puli COX17), jednak w głównej mierze znajduje się ono w mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej IMS (ang. *intermembrane space*), gdzie ulokowane jest około 60% komórkowej puli COX17 (Beers i wsp. 1997).

Białko COX17 kodowane jest przez autosomalny gen *COX17*. Do roku 2000 uważano, że u człowieka gen *COX17* jest zlokalizowany na chromosomie 13, jednak badania przeprowadzone przez grupę naukowców pod kierownictwem F. A. Punter'a wykazały, że w ludzkim genomie występują dwie kopie tego genu, gen funkcjonalny i pseudogen. Dalsze analizy wykazały, że to właśnie pseudogen zlokalizowany jest na chromosomie 13 (pozycja 13q14-q21) (Punter i wsp. 2000). Gen *COX17*, kodujący białko, zlokalizowany jest natomiast na długim ramieniu chromosomu 3 w pozycji 3q13.1-q21 i składa się z 3 egzonów. Z kolei jego myszy odpowiednik *mCox17* jest zlokalizowany na chromosomie 16 w pozycji 16B3-B4 i również składa się z 3 egzonów (Takahashi i wsp. 2001). Ludzki i myszy gen *COX17/Cox17* wykazują aż 92% podobieństwa na poziomie sekwencji nukleotydów (Kako i wsp. 2000, Punter i wsp. 2000). Ekspresja genu *COX17/Cox17* jest wysoka w tkankach i organach, gdzie procesy oddychania komórkowego oraz zapotrzebowanie na energię są szczególnie nasilone, a do tej grupy tkanek należą przede wszystkim serce, mózg, czy też nerki. Z kolei w jelicie cienkim, wątrobie, śledzionie oraz jądrach ekspresja tego genu jest stosunkowo niska (Kako i wsp. 2000, Punter i wsp. 2000). Ekspresja genu *COX17/Cox17* jest niezwykle istotna zarówno w trakcie życia prenatalnego, jak i postnatalnego. Inaktywacja genu *mCox17* u myszy jest letalna i prowadzi do zamierania zarodka na wczesnych etapach rozwoju prenatalnego (około E8.5 –E10 dnia życia embrionu) (Takahashi i wsp. 2002). Poziom ekspresji genu *Cox17*

zmienia się w trakcie życia osobnika, co wykazano w badaniach przeprowadzonych na szczurach. U szczurów wysoką ekspresję genu *Cox17* wykryto w tkance serca w 20 dniu życia prenatalnego, a poziom ekspresji genu ciągle wzrastała poczynając od wczesnego okresu postnatalnego, aż do osiągnięcia przez zwierzę wieku dorosłego (Kako i wsp. 2000).

Białko COX17 zostało po raz pierwszy opisane u zmutowanego szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, których fenotyp jest związany z niewydolnością procesu oddychania komórkowego wynikający z dysfunkcji oksydazy cytochromu c (Beers i wsp. 1997, Glerum i wsp. 1996, Srinivasan i wsp. 1998).

COX17 to małe białko o wielkości około 8 kDa. Po utworzeniu kompleksu pomiędzy białkiem COX17 i jonem miedzi białko to przyjmuje strukturę monomeru, dimeru lub tetrameru (Arnesano i wsp. 2005, Heaton i wsp. 2000, Maxfield i wsp. 2004). W cytoplazmie COX17 występuje najczęściej w formie dimeru, natomiast w IMS występuje głównie w formie tetrameru, łączącego się w klastry. Uważa się, że ta ostatnia forma COX17 stanowi rezerwuuar jonów Cu wewnątrz mitochondrium. Z kolei monomery COX17 występują zarówno w cytoplazmie, jak i w IMS mitochondrium (Arnesano i wsp. 2005, Heaton i wsp. 2000, Maxfield i wsp. 2004). Mechanizm transportu białka COX17 do przestrzeni międzybłonowej mitochondrium nie został do końca wyjaśniony. Przypuszcza się, że w procesie tym bierze udział białko MIA40 (Banci i wsp. 2011, Beers i wsp. 1997, Cobine i wsp. 2006, Glerum i wsp. 1996, Maxfield i wsp. 2004). W przestrzeni IMS białko COX17 przekazuje transportowane jony do kolejnych białek, które następnie dostarczają je do oksydazy cytochromu c (CCO). U ssaków za transport miedzi do enzymu CCO w obrębie mitochondrium odpowiadają inne metalochaperony: SCO1, SCO2 i COX11. Białka te są zlokalizowane w wewnętrznej błonie mitochondrialnej i pośredniczą one w przekazywaniu jonów miedzi do cząsteczki enzymu. Przypuszcza się, że białko COX11 pośredniczy w przekazywaniu jonów miedzi pomiędzy białkiem COX17, a cząsteczką CCO, natomiast białka SCO1 i SCO2 nie uczestniczą bezpośrednio w transporcie jonów miedzi, lecz pełnią funkcję oksydoreduktaz (Beers i wsp. 1997, Cobine i wsp. 2006, Glerum i wsp. 1996, Maxfield i wsp. 2004). Z kolei oksydaza cytochromu c jest ostatnim kompleksem łańcucha oddechowego, a jony miedzi wbudowane są w grupy prostetyczne tego enzymu (Glerum i wsp. 1996).

3. 5. Białka ATP7A oraz ATP7B – ATPazy transportujące jony miedzi

Białka ATP7A i ATP7B są ATPazami wbudowanymi w komórce w błonę aparatu Golgiego. Białka te wiążą jednowartościowe jony miedzi i wykorzystując energię pochodzącą

z rozpadu cząstek ATP pośredniczą w ich transporcie przez błony komórkowe (Lutsenko i wsp. 2007). ATPazy ATP7A i ATP7B pomimo bardzo podobnej funkcji oraz zbliżonego planu budowy kodowane są przez dwa różne geny.

U człowieka gen *ATP7A* (ang. *ATPase copper transporting alpha*) został po raz pierwszy opisany w 1993 roku (Chelly i wsp. 1993, Mercer i wsp. 1993, Vulpe i wsp. 1993). Gen ten zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu X w pozycji Xq13 (Chelly i wsp. 1993, Harris 2000, Horn i Tumer 1999, Lutsenko i wsp. 2007). Jest to stosunkowo duży gen obejmujący 140 000 par zasad (ncbi.nlm.nih.gov), a jego sekwencje kodujące obejmują 23 egzony (Harris 2000, Horn i Tumer 1999, Lutsenko i wsp. 2007). Gen *ATP7A* ulega ekspresji we wszystkich komórkach organizmu, dlatego uznawany jest za jeden z genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*), przy czym najwyższą ekspresję genu *ATP7A* stwierdzono w mózgu, nerkach, naczyniach krwionośnych oraz jelicie cienkim (Godwin i wsp. 2006, Moore i wsp. 2002, Ravia i wsp. 2005, Voskoboinik i wsp. 2001). W 1994 roku odkryto również mysi homolog tego genu, zlokalizowany u myszy również na chromosomie X w locus *mottled* - gen *Atp7a* (Cecchi i Avner 1996, Levinson i wsp. 1994, Lutsenko i wsp. 2007, Reed i Boyd 1997). Istnieje bardzo wysoki stopień podobieństwa na poziomie sekwencji nukleotydów pomiędzy ludzkim i mysim genem *ATP7A/Atp7a* który wynosi powyżej 90% (Barry i wsp. 2010, Gupta i Lutsenko 2009, La Fontaine i Mercer 2007, Lutsenko i wsp. 2007). Badania przeprowadzone na myszach laboratoryjnych wykazały, że ekspresja tego genu zachodzi zarówno w życiu prenatalnym, jak i postnatalnym. Ekspresję genu *Atp7a* stwierdzono już u około 7-dniowych zarodków mysich (Cecchi i wsp. 1997).

Kodowane przez gen *ATP7A/Atp7a* białko ma bardzo zbliżoną strukturę u człowieka i u myszy. U człowieka białko ATP7A jest pojedynczym polipeptydem o masie cząsteczkowej 180 kDa złożonym z 1500 aminokwasów (natomiast u myszy białko to złożone jest z 1491 aminokwasów o masie cząsteczkowej 190 kDa) (La Fontaine i Mercer 2007, Lutsenko i wsp. 2007, Velthuis i wsp. 2009). W dalszej części rozdziału jego budowa zostanie omówiona na przykładzie ludzkiego białka ATP7A.

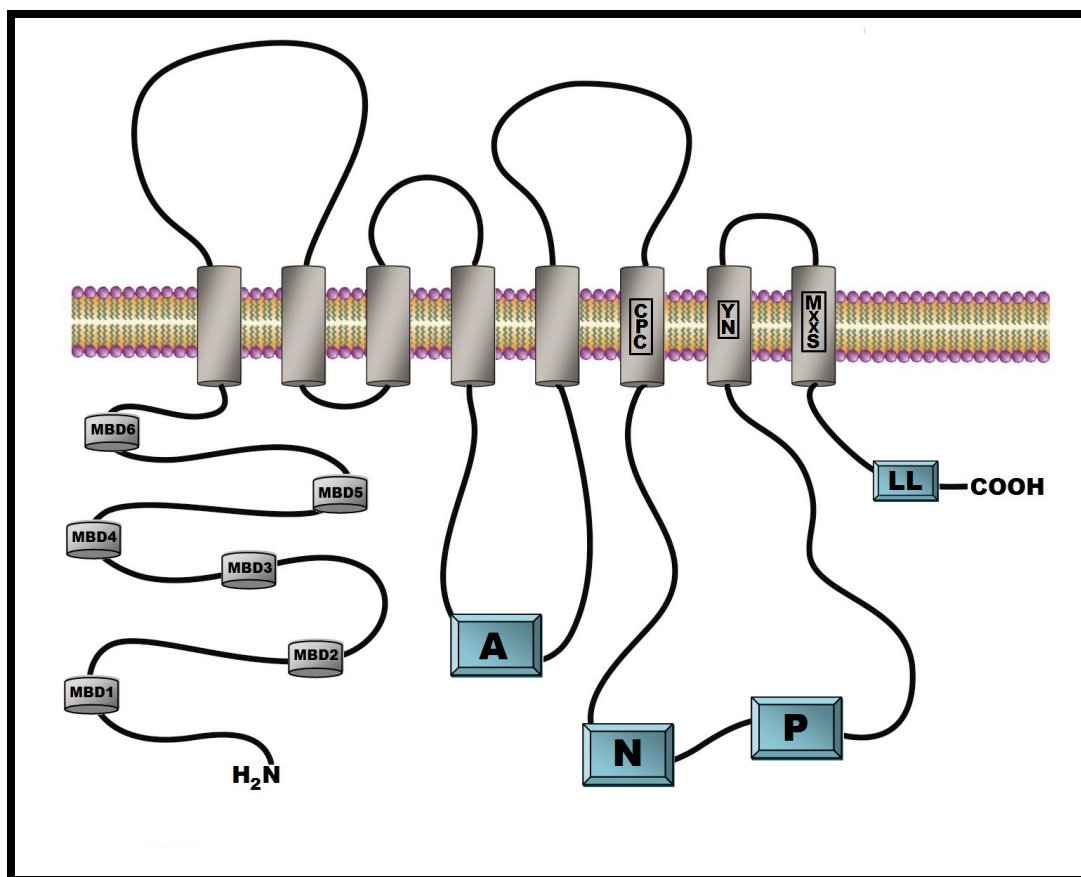
Białko ATP7A należy do białek transbłonowych, a jego łańcuch aminokwasowy 8-krotnie przechodzi przez błonę aparatu Golgiego. W budowie tego białka wyróżnić można kilka wysoce charakterystycznych domen i motywów, dzięki którym białko to pełni swą podstawową funkcję transportera jonów miedzi (La Fontaine i Mercer 2007, Lutsenko i wsp. 2008, Velthuis i wsp. 2009). W obrębie N-końcowej części cząsteczki tego białka zlokalizowane jest 6 charakterystycznych, hydrofilowych domen MBD1-MBD6 (ang. *metal-binding domain*), z których każda zawiera motyw GMT/HCxxCxxxIE umożliwiający

wiązanie jednowartościowych jonów miedzi (Jensen i wsp. 1999, Lutsenko i wsp. 2008). Domeny te łączą się z resztą cząsteczki za pomocą krótkiej sekwencji (ang. *stalk region*) z transmembranowymi domenami TMD. Kolejne 8 domen TMD1-TMD8 odpowiedzialnych jest za umiejscowienie ATPazy w błonie aparatu Golgiego oraz za utworzenie w jej obrębie kanału, dzięki czemu możliwy jest transport jonów miedzi (Wang i wsp. 2011). W obrębie tych domen można zlokalizować kilka wysoce konserwatywnych motywów, do których zaliczany jest motyw CPC (domena TMD6), motyw YN (domena TMD7) oraz motyw MxxS (domena TMD8). Te charakterystyczne rejony są kluczowe dla transportu jonów Cu^+ przez błonę aparatu Golgiego (Arguello i wsp. 2007, Lutsenko i wsp. 2008, Van den Berghe i Klomp 2010, Wang i wsp. 2011). Pomędzy domenami transmembranowymi zlokalizowane są domeny cytoplazmatyczne, kluczowe dla procesów katalitycznych tego białka, polegających na transporcie jonów miedzi przez błony biologiczne. Pomędzy domeną TMD6 i TMD7 umiejscowiona jest duża domena cytoplazmatyczna, w obrębie której znajdują się miejsca odpowiedzialne za proces wiązania ATP (subdomena N) oraz miejsce fosforylacji białka ATP7A (subdomena P). Procesy te są niezbędne dla zmiany konformacji białka w czasie transportu jonów miedzi przez kanał błonowy. Proces defosforylacji białka zależny jest od zlokalizowanej pomiędzy TMD4 oraz TMD5 hydrofilowej domeny A (Barry i wsp. 2010, Harris 2000, Lutsenko i wsp. 2008). W komórkach białko ATP7A uczestniczy we włączaniu jonów miedzi do cząsteczek miedziozależnych enzymów podlegających obróbkom potranslacyjnym w obrębie aparatu Golgiego, takich jak monooksygenaza α -amidująca peptydyloglicyny, β -monooksygenaza dopaminy, tyrozynaza, czy też oksydaza lizylowa (Lutsenko i wsp. 2007, Petris i wsp. 2000, Steveson i wsp. 2003, Van den Berghe i Klomp 2010, Veldhuis i wsp. 2009).

Białko ATP7A pełni również kluczową rolę w utrzymaniu stałego stężenia kationów miedzi w komórce. W przypadku, kiedy stężenie miedzi w komórce wzrasta powyżej poziomu fizjologicznego, białko ATP7A po związaniu jonów miedzi przez domeny MBD zamykane jest w pęcherzykach klatrynowych i ulega relokalizacji do błony komórkowej. Następnie błony pęcherzyka oraz komórki ulegają fuzji, dzięki czemu zawartość pęcherzyka zostaje usunięta na zewnątrz komórki na drodze egzocytozy. Po usunięciu nadmiaru miedzi białko wraca do aparatu Golgiego (La Fontaine i Mercer 2007, Lutsenko i wsp. 2007, Mercer i wsp. 2003). W procesie powrotnego transportu białka ATP7A z błony komórkowej do błon aparatu Golgiego główną rolę odgrywa domena C-końcowa. W obrębie tej domeny znajduje się dileucynowy motyw LL odpowiedzialny za transport powrotny tego białka do aparatu

Golgiego, jak również za transport tego białka do błony bazalnej w komórkach o spolaryzowanej budowie (Hsi i Cox 2004, Lutsenko i wsp. 2007, Petris i wsp. 1998).

Rycina 4 przedstawia schematyczną budowę białka ATP7A (Ryc. 4).



Ryc. 4. Schemat budowy białka ATP7A. Białko ATP7A jest transmembranowym polipeptydem zakotwiczonym za pomocą ośmiu hydrofobowych, transbłonowych domen w błonie aparatu Golgiego. Zarówno N-końcowa, jak i C-końcowa część białka ATP7A zorientowane są w kierunku cytoplazmy komórkowej. W N-końcowej części białka znajduje się sześć domen MBD, które odpowiedzialne są za przyłączenie jonów miedzi. W obrębie domeny 6 zlokalizowana jest unikatowa sekwencja CPC, odpowiedzialna za transport jonów miedzi przez błonę białkowo-lipidową. Cytoplazmatyczna subdomena N odpowiedzialna jest za przyłączenie cząsteczki ATP, a następnie jej hydrolizę w cyklu katalitycznym, dzięki czemu pozyskiwana jest energia wykorzystywana do transportu jonów miedzi przez błonę. W obrębie subdomeny P dochodzi do fosforylacji białka. Domena A odpowiedzialna jest za proces defosforylacji ufosforylowanego wcześniej białka ATP7A. Dileucynowa sekwencja LL zlokalizowana w obrębie C-końcowej części białka odpowiada za transport powrotny

białka ATP7A z błony komórkowej do aparatu Golgiego (Lenartowicz i wsp. 2015b - zmodyfikowano).

Również w 1993 roku nastąpiło odkrycie drugiej ATPazy transportującej kationy miedzi - białka ATP7B (ang. *ATPase copper transporting betha*), kodowanego przez gen *ATP7B*. U człowieka gen *ATP7B* zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 13 w pozycji 13q14.3 (Allen i wsp. 2006, Bull i wsp. 1993, Cecchi i Avner 1996, Coronado i wsp. 2001, Huster i wsp. 2007, Lutsenko i wsp. 2007). Najwyższy poziom ekspresji tego genu stwierdzono w wątrobie, mózgu oraz jądrach (Harris 2000, Kuo i wsp. 1997, La Fontaine i Mercer 2007, Linz i Lutsenko 2007, Lutsenko i wsp. 2007, Ogórek i wsp. 2017).

Białko ATP7B jest wbudowany w błony aparatu Golgiego, podobnie jak białko ATP7A. Białko ATP7B zbudowane jest z 1465 aminokwasów osiągając masę cząsteczkową około 157 kDa (proteintlas.org/ENSG00000123191-ATP7B/tissue). Ogólna budowa białek ATP7A oraz ATP7B jest bardzo podobna, jednak w obrębie struktury białka ATP7B istnieją dodatkowe sekwencje, których brak jest w strukturze białka ATP7A. W obrębie N-końcowego odcinka białka ATP7B znajduje się charakterystyczny motyw 9 aminokwasów (₃₇FAFDNVGYE₄₅), który najprawdopodobniej jest odpowiedzialny za transport ATPazy do apikalnej błony hepatocytów (Braiterman i wsp. 2009). Ponadto w rejonie C-końca białka ATP7B znajduje się trileucynowy motyw (LLL), który odpowiada za transport ATPazy pomiędzy błonami aparatu Golgiego oraz błony komórkowej w obrębie komórki (Cater i wsp. 2006).

Białko ATP7B w hepatocytach uczestniczy w procesie włączania jonów miedzi do apo-ceruloplazminy. Jest ono również kluczowym białkiem biorącym udział w transporcie jonów tego pierwiastka do żółci, dzięki czemu nadmiar miedzi jest usuwany z organizmu (Barry i wsp. 2010, Gupta i Lutsenko 2009, Linz i Lutsenko 2007, Lutsenko i wsp. 2007). U człowieka mutacje występujące w obrębie genu *ATP7B* prowadzą do zaburzeń metabolizmu miedzi, a zespół występujących u pacjentów schorzeń określa się mianem choroby Wilsona (De Bie i wsp. 2007, Horn i Tumer 1999, Lutsenko i wsp. 2007).

3. 6. Mutacje w obrębie genu *ATP7B* prowadzą u człowieka do choroby Wilsona

Choroba Wilsona (WD; ang. *Wilson's disease*) jest autosomalną chorobą genetyczną, związaną z zaburzeniem metabolizmu miedzi wywołanym mutacją w genie *ATP7B*. Choroba ta występuje z częstotliwością 1 : 30 000 – 1 : 100 000 urodzeń (De Bie i wsp. 2007, Thomas i wsp. 1995). W wyniku braku aktywności białka ATP7B u pacjentów miedź akumulowana jest w wątrobie, a także nerkach oraz gałce ocznej. Wysoki poziom miedzi

gromadzony jest również w mózgu, co z kolei prowadzi do występowania u chorych zaburzeń na tle neurologicznym takich jak dystonia, niezdolność ruchowa, czy drgawki (De Bie i wsp. 2007, Huster 2010, Machado i wsp. 2006, Strausak i wsp. 2001). W wyniku braku aktywności białka ATP7B w hepatocytach nie dochodzi do syntezy ceruloplazminy, która jest głównym transporterem jonów miedzi w krwi (Di Donato i Sarkar 1997, Huster i Lutsenko 2007). Równocześnie zakumulowana w obrębie wątroby miedzi osiąga poziom toksyczny wywołując w konsekwencji uszkodzenie tego organu (Machado i wsp. 2006, Strausak i wsp. 2001). Ze zniszczonych hepatocytów jest ona uwalniana do krwi w wysokim stężeniu, a gwałtowny wzrost toksycznego pierwiastka powoduje uszkodzenie erytrocytów, co prowadzi do anemii hemolitycznej. Jednocześnie u pacjentów miedź jest akumulowana w nerkach, co skutkuje uszkodzeniem tych organów.

3. 7. Choroba Menkesa – dziedziczne zaburzenie metabolizmu miedzi u człowieka wywołane mutacją w genie *ATP7A*

Choroba Menkesa (MD; ang. *Menkes disease*) jest ciężkim schorzeniem metabolicznym wywołanym mutacją w genie *ATP7A*. Na chorobę tą zapadają głównie chłopcy, co związane jest z lokalizacją zmutowanego genu na chromosomie X. Nazwa choroby pochodzi od nazwiska jej odkrywcy Johna Hansa Menkesa, który po raz pierwszy opisał to schorzenie w 1962 roku. Opis swój oparł na analizie rodziny, w której na przestrzeni dwóch pokoleń urodziło się pięciu chłopców, u których obserwowano charakterystyczne objawy, takie jak upośledzenie umysłowe, spowolniony rozwój, epilepsję, problemy neurologiczne, a także charakterystyczne, białe włosy o nietypowej strukturze (Menkes i wsp. 1962). Przyczynę choroby Menkesa na poziomie molekularnym odkryto dopiero w 1993 roku, kiedy to trzy niezależne grupy badawcze po raz pierwszy opisały u człowieka gen *ATP7A* kodujący białko ATP7A odpowiedzialne za komórkowy transport jonów miedzi (Chelly i wsp. 1993, Mercer i wsp. 1993, Vulpe i wsp. 1993).

U pacjentów, mutacja genu *ATP7A* prowadzi do utraty funkcjonalności kodowanego przez ten gen białka. Obecnie znanych jest około 357 mutacji w obrębie genu *ATP7A* (Moller i wsp. 2009). Najczęściej są to mutacje nonsensowne oraz mutacje zmiany sensu, małe insercje, delecje, a także mutacje związane z nieprawidłowym składaniem egzonów (De Bie i wsp. 2007, Hsi i Cox 2004, Moller i wsp. 2009, Tumer i wsp. 1999). Brak aktywności białka ATP7A skutkuje zahamowaniem procesu absorpcji jonów miedzi z pokarmu, gdyż białko to odpowiada za transport jonów miedzi z komórek jelita cienkiego do krwioobiegu. Miedź gromadzi się więc w enterocytach i nie jest dostarczana do tkanek i narządów organizmu, co

skutkuje ogólnoustrojowym niedoborem tego pierwiastka. Niedobór miedzi prowadzi do obniżenia aktywności wielu enzymów, które biorą udział w podstawowych, a często wręcz kluczowych reakcjach zachodzących w komórkach (Lutsenko i wsp. 2007, Tumer i Moller 2010). Pomimo tego, że choroba Menkesa jest określana mianem ogólnoustrojowego niedoboru miedzi, to jednak oprócz jelita cienkiego, w którym pierwiastek ten jest akumulowany, wysoki poziom miedzi odnotowuje się również w nerkach pacjentów, co prowadzi do poważnego uszkodzenia tego organu (Kodama i wsp. 2012, Zaffanello i wsp. 2006). Objawy chorobowe nasilają się wraz z wiekiem pacjentów. W pierwszym okresie życia u dzieci cierpiących na chorobę Menkesa nie występują żadne objawy chorobowe, a rozwój noworodków przebiega pozornie w sposób prawidłowy. Jedynymi mogącymi budzić niepokój objawami są odbarwione włosy o charakterystycznej strukturze przypominające owczą wełnę, jak również luźna, biała skóra. Pierwsze objawy obserwowane są u dzieci w okresie 2-4 miesiąca życia - wtedy zaczynają się pojawiać problemy na tle motorycznym związane z regresją rozwojową, drgawki, osłabienie kończyn, a także nadmierna senność czy problemy ze strony układu pokarmowego (wymioty, biegunka). Mogą też występować hipotermia, hipoglikemia oraz problemy z przyjmowaniem pokarmu. Wyraźne objawy chorobowe specyficzne dla tego syndromu metabolicznego obserwowane są u dzieci w wieku 5-6 miesięcy i nasilają się wraz z wiekiem chorego (Tumer 2013). U dzieci nasilają się objawy neurologiczne, takie jak epilepsja oraz drgawki, u części młodych pacjentów obserwuje się również osłabienie mięśni, a także upośledzenie umysłowe. W tym okresie pojawiają się problemy związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu krążenia (wady w budowie naczyń krwionośnych), układem kostnym (wady w budowie kości, osteoporoza), zaburzenia w budowie i funkcjonowaniu układu moczowego (uchyłkowatość pęcherza, infekcje układu moczowego) (Hamer 1993, Kageyama i wsp. 1997, Kaler i wsp. 2008, Kaler 2011, Kim i wsp. 2019, Kodama i wsp. 2012, Oshio i wsp. 1997, Zaffanello i wsp. 2006). Opisane powyżej objawy chorobowe charakterystyczne są dla ostrej formy choroby Menkesa, która kończy się śmiercią pacjentów w okresie od 3 do 5 roku życia, a głównymi przyczynami śmierci są powikłania związane przede wszystkim z układem krwionośnym (krwotok w mózgu wywołany pęknięciem naczyń krwionośnych) lub postępująca degeneracja komórek nerwowych (Kaler 2013, Tumer i Moller 2010).

Obecnie znana jest również druga forma choroby Menkesa i jest to jej łagodniejsza odmiana nosząca nazwę syndromu rogu potylicznego (OHS; ang. *occipital horn syndrome*). Nazwa tej choroby pochodzi od występującego u pacjentów charakterystycznego zwapnienia sięgającego od mięśnia czworobocznego i mostkowo-obojętkowo-sutkowego do kości

potylicznej (ang. *occipital horns*). W przypadku tego wariantu choroby pacjenci mogą żyć nawet do 50 roku życia (Proud i wsp. 1996, Tumer i Moller 2010). Objawy OHS związane są z nieprawidłową strukturą tkanki łącznej, co skutkuje występowaniem wad w budowie szkieletu (między innymi występowaniem charakterystycznej guzowatości na kości potylicznej), problemy na tle rozwoju motorycznego (hipotonia mięśniowa), częste występowanie przepuklin, infekcje układu moczowego, a także nadmierna elastyczność skóry i stawów. W przypadku tego wariantu choroby Menkesa nie obserwuje się natomiast upośledzenia umysłowego bądź występuje ono w stopniu lekkim (Horn i Tumer 1999, Proud i wsp. 1996, Tumer i Moller 2010).

Pomimo, że podłoże molekularne choroby Menkesa jest znane oraz opisano i scharakteryzowano objawy patologiczne występujące u pacjentów cierpiących na ten rzadki syndrom metaboliczny, to jednak nie znaleziono dotychczas skutecznej terapii ratującej życie chorych. Najczęściej stosowaną terapią jest podawanie pacjentom związków miedzi w postaci dożylnych lub podskórnych iniekcji kompleksu miedź-histydyna. Terapia ta pozwala na wydłużenie życia pacjentów oraz pozwala na częściową redukcję objawów patologicznych związanych z chorobą (Christodoulou i wsp. 1998, Sarkar i wsp. 1993, Tumer i Moller 2010). Leczenie tej choroby napotyka na szereg trudności. Bardzo ważnym jest czas rozpoczęcia terapii, który powinien nastąpić zaraz po urodzeniu dziecka. Terapia powinna być wdrożona w okresie, kiedy w mózgu dziecka nie została jeszcze wykształcona w pełni bariera krew-mózg. Jest to niezwykle ważne, gdyż niedobór miedzi prowadzi do zaburzeń w rozwoju układu nerwowego oraz do nieodwracalnych zmian w mózgu (Kaler 2014, Kim i wsp. 2015). Zalecane jest, aby terapię związkami kompleksu miedź-histydyna wprowadzić u chorych noworodków do 30 dnia życia (Vairo i wsp. 2018). Stosowanie iniekcji miedź-histydyna u noworodków, u których w okresie życia prenatalnego nie zdiagnozowano odpowiednio wcześnie choroby, tylko częściowo redukuje niektóre z zaburzeń neurologicznych, np. napady epileptyczno-drgawkowe oraz wpływa pozytywnie na rozwój umysłowy pacjentów (Desai i Kaler 2008, Fujii i wsp. 1990, Kaler i wsp. 2008, Kodama i wsp. 2011, Kodama i wsp. 2012, Tumer i Moller 2010).

U pacjentów, pomimo stosowanej terapii, utrzymanie stałego i zbliżonego do fizjologicznego poziomu miedzi w surowicy krwi (tzn. 70–150 µg/dl) jest bardzo trudne, co jest związane z wychwytem oraz gromadzeniem miedzi w takich organach, jak dwunastnica oraz nerki (Kodama i Murata 1999, Kodama i wsp. 2012, Zaffanello i wsp. 2006). U pacjentów pobieranie jonów miedzi zarówno przez enterocyty jelita, jak również komórki kanalików nerkowych zachodzi przy udziale białka CTR1, jednak w wyniku braku

aktywności białka ATP7A usunięcie pobranych jonów z komórek jest niemożliwe (Kodama i Murata 1999, Lenartowicz i wsp. 2015b, Lutsenko i wsp. 2007, Tumer i Moller 2010). U pacjentów w wyniku akumulacji miedzi w nerkach oraz zaburzeniu budowy dróg wyprowadzających mocz, dochodzi do uszkodzenia nerek oraz licznych infekcji układu moczowego (Oshio i wsp. 1997, Zaffanello i wsp. 2006).

Obecnie opracowywane są nowe formy terapii, gdzie miedź podawana jest z wykorzystaniem związków chelatujących, co może pozwolić na obniżenie progu akumulacji tego pierwiastka w nerkach (Horn i wsp. 2019, Lenartowicz i wsp. 2012b). Tym samym niezwykle istotnym jest poznanie nowych mechanizmów molekularnych związanych z metabolizmem miedzi w nerkach, w których następuje akumulacja tego metalu. Do badań nad nowymi formami terapii w chorobie Menkesa wykorzystuje się myszy z mutacjami w genie *Atp7a*.

3. 8. Myszy z mutacją w genie *Atp7a* – charakterystyka mutacji *mottled*

Podobnie, jak u ludzi, również u myszy mutacje w obrębie genu *Atp7a* prowadzą do wykształcenia fenotypu patologicznego. Mutacje w genie *Atp7a* u myszy pojawiły się w sposób spontaniczny lub indukowany niezależnie w różnych hodowlach myszy laboratoryjnych na świecie. Obecnie poznano i scharakteryzowano 15 rodzajów mutacji w obrębie genu *Atp7a* u myszy należących do grupy mutantów *mottled* (Lenartowicz i wsp. 2015b). Mutacje te należą do grupy mutacji recesywnych. Hemizygotyczne samce (*mo*^{-/-}) oraz homozygotyczne samice (*mo*/*mo*) wykazują cały szereg objawów chorobowych, natomiast heterozygotyczne samice (*mo*/⁺), będące nosicielkami zmutowanego genu, są płodne i żywotne. W zależności od rodzaju mutacji w obrębie genu *Atp7a* mutacje *mottled* w różnym stopniu upośledzają żywotność hemizygot oraz homozygot, a także skutkują różnym stopniem nasilenia objawów chorobowych oraz letalnością na różnych etapach życia zwierząt. Wyodrębnione zostały trzy główne grupy mutantów *mottled* (Lenartowicz i wsp. 2015b).

Do grupy pierwszej zaliczane są myszy, u których mutacje w obrębie genu *Atp7a* prowadzą do śmierci hemizygot (*mo*^{-/-}) już w okresie prenatalnym. Myszy mutanty należące do tej grupy są wykorzystywane do badań nad zaburzeniami metabolizmu miedzi w trakcie rozwoju płodu i zarodka. U mutantów należących do tej grupy zazwyczaj stwierdza się rozległe delecje lub insercje w obrębie genu *Atp7a*. Przyczyną mutacji *dappled* (*Atp7a*^{*mo-dp*}) jest duża delecja, która obejmuje sekwencję promotora genu *Atp7a* (Haddad i wsp. 2014). Samce mutanty *dappled* zamierają pomiędzy 17, a 18 dniem życia prenatalnego, a u

obumarłych płodów stwierdzono liczne tętniaki w obrębie naczyń krwionośnych oraz wady w budowie szkieletu (Mercer i wsp. 1994). U mutantów *mottled spot* (*Atp7a^{mo-spot}*) gen *Atp7a* pozbawiony jest odcinka od egzonu 11 do 14, natomiast u mutantów *Atp7a^{mo-1Pub}* występuje brak egzonu 14 (Cecchi i Avner 1996, Cunliffe i wsp. 2001). Delecja 1440 par zasad obejmująca odcinek pomiędzy intronem 22, a egzonem 23 genu *Atp7a* skutkuje letalnością zarodków mutantów *tohoku* (*Atp7a^{mo-tohm}*) (Mototani i wsp. 2006). W przypadku mutantów *candy* (*Atp7a^{mo-ca}*) letalność mutacji jest wywołana przez insercję 81 par zasad w obrębie egzonu 10 genu *Atp7a* (Cunliffe i wsp. 2001).

Do drugiej grupy mutantów zaliczane są osobniki z zaburzonym metabolizmem miedzi, które umierają w przeciągu 3 pierwszych tygodni życia. U samców mutantów tej grupy występuje szereg objawów patologicznych spowodowanych zaburzeniami metabolizmu miedzi, przypominających te opisane u pacjentów z chorobą Menkesa. Samce mutanty charakteryzują się depigmentacją sierści, występują u nich, nasilające się wraz z wiekiem, zaburzenia neurologiczne (drgawki, drżenia, niedowłady), często występuje biegunka czy hipotermia (Lenartowicz i wsp. 2015b). Mutanty te ze względu na zbieżność objawów patologicznych, są wykorzystywane w badaniach nad chorobą Menkesa, a w szczególności nad ostrą formą tej choroby, dlatego też poddawane są licznym badaniom i dokładnej charakterystyce w wielu laboratoriach na świecie. Badania te są szczególnie ważne wobec trudności w ustaleniu terapii w chorobie Menkesa. Do tej grupy zaliczane są mutanty *brindled* (*Atp7a^{mo-br}*) (Grimes i wsp. 1997, Royce i wsp. 1982), *macular* (*Atp7a^{mo-ml}*) (Kim i Petris 2007, Kodama i Murata 1997) oraz *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2004, Lenartowicz i wsp. 2010a, Lenartowicz i wsp. 2011, Styrna 1977). Jakkolwiek fenotypy samców mutantów *brindled*, *macular* czy *mosaic* są bardzo podobne, to podłoże genetyczne tych mutacji jest różne. U myszy *brindled* przyczyną defektu genetycznego jest delecja 6 nukleotydów w egzonie 11 genu *Atp7a* skutkująca usunięciem dwóch aminokwasów, alaniny w pozycji 799 oraz leucyny w pozycji 800, w białku ATP7A. Utrata dwóch aminokwasów u mutantów *brindled* zachodzi w obrębie konserwatywnej domeny A w białku ATP7A, co prowadzi do zaburzeń w wewnątrzkomórkowym transporcie miedzi (Grimes i wsp. 1997, La Fontaine i wsp. 1999). U mutantów *macular* mutacja polega na transwersji nukleotydu tyminy na cytozynę w egzonie 22, co skutkuje zamianą seryny na prolinę w pozycji 1381 białka ATP7A (Kim i Petris 2007). Brak aktywności białka ATP7A u samców mutantów *mosaic* spowodowany jest mutacją zmiany sensu w egzonie 15 genu *Atp7a* (Lenartowicz i wsp. 2012a). Dokładna charakterystyka tej mutacji zostanie przedstawiona w podrozdziale 3.10.

Do trzeciej grupy mutantów *mottled* należą zwierzęta, które charakteryzują się wysoką żywotnością osiągając wiek nawet kilku miesięcy i są one uznawane za zwierzęce modele łagodnej formy choroby Menkesa (OHS) (Lenartowicz i wsp. 2015b). Opisano tutaj dwie mutacje *viable-brindled* oraz *blotchy* (Cecchi i Avner 1996, Das i wsp. 1995, Reed i Boyd 1997). U mutantów *viable-brindled* zaburzenia metabolizmu miedzi wywołane są przez mutację punktową zmiany sensu w egzonie 16 genu *Atp7a*, która skutkuje substytucją lizyny w treoninę w pozycji 1036 białka ATP7A. Następstwem tej mutacji jest zmiana komórkowej lokalizacji białka ATP7A, jak również znaczne obniżenie jego aktywności (Kim i Petris 2007). U samców *blotchy* występuje mutacja polegająca na nieprawidłowym składaniu egzonów genu *Atp7a*. U myszy tych tworzą się dwa rodzaje produktów, niewielka ilość produktu prawidłowego będącego funkcjonalnym białkiem ATP7A oraz produkt niefunkcyjny białka ATP7A. Nieprawidłowe składanie egzonów spowodowane jest mutacją w obrębie intronu 11 genu *Atp7a* skutkującą pominięciem 92 par zasad egzonu 11, co w konsekwencji przesuwam ramkę odczytu w procesie translacji (Das i wsp. 1995, La Fontaine i wsp. 1999, Mercer i wsp. 1994).

3. 9. Mutanty *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) – zwierzęcy model choroby Menkesa

Myszy mutanty *mosaic* należą do drugiej grupy mutacji *mottled* i są uznawane za zwierzęcy model choroby Menkesa. U tych zwierząt mutacja w genie *Atp7a* zlokalizowana jest w egzonie 15. W pozycji 3009 doszło do zamiany guaniny na cytozynę. Następstwem tej mutacji jest zamiana argininy na prolinę, w pozycji 977, w pobliżu wysoce konserwatywnego motywu CPC zlokalizowanego w obrębie domeny TMD6 białka ATP7A (Lenartowicz i wsp. 2012a). Zmiana alkalicznego, hydrofilowego i dodatnio naładowanego aminokwasu argininy na obojętny, hydrofilowy aminokwas prolina najprawdopodobniej prowadzi do zmiany w trzeciorzędowej strukturze białka, która leży u podstaw braku funkcjonalności białka w komórkach mutantów *mosaic* (Lenartowicz i wsp. 2012a).

Mutacja ta pojawiła się spontanicznie u osobników pochodzących z niekrewniaczego stada *outbred* w 1965 roku, w hodowli zwierząt Zakładu Genetyki i Ewolucjonizmu Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, a następnie została opisana przez Profesor H. Krzanowską w 1966 roku (Krzanowska 1966). Mutacja ta jest letalna dla hemizygotycznych samców i homozygotycznych samic. Natomiast heterozygotyczne samice pozostają żywotne, są też płodne i przekazują zmutowany gen potomstwu. Samce mutanty *mosaic* umierają pomiędzy 15, a 17 dniem życia. Tylko 4% samców *mosaic* przeżywa do wieku dorosłego i może być płodna (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i Sasuła 2000, Styra 1977). Samce mutanty *mosaic*

można odróżnić od pozostałego potomstwa zaraz po urodzeniu, po charakterystycznie skręconych wibrysach. Wraz z wiekiem obserwuje się u tych zwierząt również depigmentację sierści oraz zaburzenia w strukturze włosów (Migdał i Juszczak 1975, Radochońska 1970, Styra 1977). U mutantów obserwuje się również spadek masy ciała od około 8 dnia życia osobników, problemy ze strony układu pokarmowego (biegunka), spowolniony rozwój, czy też postępujące problemy neurologiczne, takie jak drgawki, drżenie i niedowład kończyn (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2012a, Lenartowicz i wsp. 2017, Radochońska 1970, Styra 1977). Przeprowadzone analizy biochemiczne wykazały spadek aktywności miedziozależnego enzymu oksydazy o-dwufenolowej (Styra 1977), co skutkuje depigmentacją sierści samców mutantów *mosaic*. Ponadto w surowicy krwi odnotowano spadek ilości ceruloplazminy, co wpływa na zaburzenia metabolizmu żelaza u tych zwierząt (Lenartowicz i wsp. 2014, Lenartowicz i wsp. 2017, Styra 1977). Analizy zawartości miedzi w wybranych organach wewnętrznych 14-dniowych samców mutantów *mosaic* wykazały, że miedź jest akumulowana w ścianach jelita cienkiego oraz w nerkach, natomiast w wątrobie, sercu oraz mózgu stwierdzono niedobór tego pierwiastka (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2002, Lenartowicz i wsp. 2011). Stosowanie u samców mutantów *mosaic* terapii podania związków miedzi z ominięciem bariery jelita, w postaci iniekcji podskórnych lub dootrzewnowych, pozwala na przedłużenie życia tych zwierząt oraz prowadzi do zredukowania niektórych objawów choroby. Samce mutanty *mosaic* poddane terapii osiągają dojrzałość, a nieliczne z nich osiągają wiek nawet 12-16 miesięcy (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2017, Styra 1977).

Stosowanie terapii podania związków miedzi u mutantów *mosaic* prowadzi jednak do ubocznych skutków, które są spowodowane wzrostem zakumulowanego pierwiastka w obrębie nerek (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2017). U myszy *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) obserwuje się występujące głównie w obrębie kory nerki patologiczne zmiany, które obejmują zarówno kłębuszki oraz kanaliki nerkowe. U tych zwierząt w obrębie kanalików nerkowych występują liczne lezje, które powstają w miejscu obumarłych nefronów. Ponadto stwierdzono występowanie atroficznych oraz uszkodzonych kłębuszków nerkowych, a także charakterystycznie powiększone jądra komórek (kariomegalia) kanalików nerkowych (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2017). U dorosłych samców mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) stwierdzono również występowanie zmian, które mogą sugerować, że w obrębie nerek dochodzi do zapoczątkowania

procesów nowotworzenia (występowanie licznych lezji wypełnionych płynem oraz licznymi koloniami komórek) (Lenartowicz i wsp. 2010b).

Zjawisko akumulacji miedzi w nerkach obserwuje się u wszystkich myszy mutantów *mottled* (Bhadhprasit i wsp. 2012, Mann i wsp. 1979, Yoshimura i wsp. 1995).

Poznano również molekularne mechanizmy procesu magazynowania tego pierwiastka w nerkach. Procesy reabsorpcji miedzi z moczu pierwotnego zachodzą głównie w początkowych odcinkach kanalików proksymalnych nerki. W obrębie komórek kanalików nerkowych jony miedzi transportowane są do białka ATP7A zlokalizowanego w obrębie błony aparatu Golgiego. Białko to, po związaniu z jonami miedzi, transportowane jest następnie do błony bazolateralnej komórki, a następnie, na drodze egzocytozy, usuwa jony metalu do naczyń krwionośnych oplatających kanaliki nerkowe (La Fontaine i Mercer 2007, Lutsenko i wsp. 2007, Mercer i wsp. 2003). W wyniku braku aktywności białka ATP7A, u samców mutantów *mosaic* dochodzi do akumulacji miedzi w komórkach nabłonkowych kanalików nerkowych (Grimes i wsp. 1997, La Fontaine i wsp. 1999, Lenartowicz i wsp. 2012a, Mann i wsp. 1979, Murata i wsp. 1997, Styrna 1977).

Dotychczas niewiele jest wiadomo, jaki jest dokładny mechanizm pobierania jonów miedzi z moczu pierwotnego u mutantów oraz czy istnieją mechanizmy umożliwiające regulację tego procesu. Nie wiadomo również, jak nadmierne stężenie miedzi w komórkach kanalików nerkowych wpływa na ekspresję białek związanych z metabolizmem tego pierwiastka w nerkach i jakie mogą być tego konsekwencje. Są to bardzo ważne pytania, gdyż podobny problem, dotyczący akumulacji miedzi w nerkach, występuje również u pacjentów z chorobą Menkesa. Poznanie tych mechanizmów jest niezwykle istotne szczególnie w świetle stosowanych u pacjentów terapii polegających na dostarczaniu związków miedzi w postaci iniekcji. Jak już wspomniano wcześniej u tych chorych następuje akumulacja miedzi w nerkach, co uniemożliwia dostarczanie jej do innych ważnych organów, takich jak mózg czy serce.

Dlatego w obecnej pracy, analizując ekspresję transporterów błonowych (CTR1 i CTR2) oraz białek metalochaperonów (ATOX1 i CCS) w nerkach samców mutantów *mosaic*, podjęto próbę znalezienia odpowiedzi na postawione wyżej pytania. Używane do badań samce mutanty *mosaic* poddano terapii polegającej na podawaniu chlorku miedzi (II) w postaci iniekcji, co przypomina sposób prowadzenia terapii u ludzi. Uzyskane w obecnej pracy wyniki mogą być wykorzystane w leczeniu pacjentów z chorobą Menkesa.

4. Cele pracy:

Gromadzenie miedzi w nerkach pacjentów z chorobą Menkesa jest ubocznym skutkiem terapii polegającej na podawaniu choremu związków miedzi w postaci iniekcji dożylnych lub podskórnych, a tym samym jest też jednym z głównych problemów obniżających efektywność zastosowanej terapii (Christodoulou i wsp. 1998, Horn i wsp. 2019, Sarkar i wsp. 1993, Tumer i Moller 2010). Podobny efekt polegający na akumulacji miedzi w nerkach zaobserwowano u myszy z mutacją w genie *Atp7a*, które są modelem zwierzęcym choroby Menkesa. U samców mutantów *mosaic* traktowanych chlorkiem miedzi (II) opisano uszkodzenia nerki spowodowane toksycznym działaniem nadmiaru miedzi. Zarówno u pacjentów z chorobą Menkesa, jak i u myszy mutantów gromadzenie miedzi w nerkach spowodowane było brakiem aktywności białka ATP7A (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2017). Celem obecnej pracy było zbadanie mechanizmów molekularnych związanych z transportem i metabolizmem miedzi, które zachodzą w nerkach myszy mutantów *mosaic*, u których następuje akumulacja miedzi w obrębie tego organu.

Celem przeprowadzonych w obecnej pracy badań było:

1. Wykazanie w jakich organach deponowana jest miedź dostarczona w postaci iniekcji roztworu chlorku miedzi (II) u samców mutantów *mosaic* i osobników o genotypie dzikim w różnych okresach życia postnatalnego oraz wykazanie, jaki wpływ ma podawanie takiej terapii na ogólną kondycję zwierząt, wyrażającą się przyrostem masy ciała myszy.
2. Komórki pobierają jony miedzi przy udziale białek z rodziny CTR (CTR1 i CTR2), a głównie przy udziale białka CTR1. Badania prowadzone na hodowlach komórkowych wykazały, że ekspresja genu i białka *Ctr1*/CTR1 regulowana jest poprzez poziom miedzi (Narayanan i wsp. 2013). Ponadto Białko CTR1 w komórkach spolaryzowanych może przyjmować lokalizację w obrębie błony apikalnej, jak również bazalnej (Bauerly i wsp. 2004, Nose i wsp. 2006, Nose i wsp. 2010, Zimnicka i wsp. 2007). Wiadomo też, że pod wpływem wysokiego stężenia miedzi białko CTR1 może ulegać internalizacji do wnętrza komórki, a także degradacji w obrębie cytoplazmy (Clifford i wsp. 2016, Guo i wsp. 2004, Petris i wsp. 2003). Kolejnym celem obecnej pracy było sprawdzenie, czy pod wpływem stosowanej terapii

chlorkiem miedzi (II) oraz pod wpływem zmian zawartości miedzi w nerkach u myszy mutantów *mosaic* występują zmiany w poziomie ekspresji transporterów błonowych odpowiadających za pobieranie jonów miedzi z moczu pierwotnego. Sprawdzono również, czy istnieje różnica w wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w nerkach u samców mutantów *mosaic* w porównaniu z osobnikami o genotypie dzikim oraz czy podawanie iniekcji chlorkiem miedzi (II) wpływa na zmianę lokalizacji tego białka w komórkach nerek u badanych grup myszy.

3. Białko ATOX1 jest jednym z głównych, wewnątrzkomórkowych transporterów jonów miedzi (Hung i wsp. 1998, Lin i wsp. 1997, Prohaska i Gybina 2004). Białko to transportuje jony miedzi do aparatu Golgiego i przekazuje je ATPazom, ATP7A i ATP7B. Jednak, jak wykazały badania przeprowadzone na komórkach hodowanych *in vitro*, białko ATOX1 może również pełnić funkcję czynnika transkrypcyjnego. W komórce białko to, pod wpływem zwiększającego się stężenia jonów miedzi, może, dzięki obecności sekwencji NLS, być transportowane do jądra komórkowego, gdzie przyłącza się do sekwencji promotora genu *Ccnd1* kodującego cyklinę D1, indukując jego transkrypcję. Wzrost ekspresji cykliny D1 przyspiesza podziały komórkowe (Itoh i wsp. 2008, Itoh i wsp. 2009). W nerkach myszy traktowanych chlorkiem miedzi (II) obserwowano nadmierną proliferację komórek kanalików nerkowych, a także występowanie komórek o nietypowej budowie tworzących kolonie, co może sugerować inicjację procesu nowotworowego (Lenartowicz i wsp. 2010b). Celem obecnej pracy było zbadanie, czy pod wpływem stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) oraz pod wpływem zmian zawartości miedzi w nerkach myszy mutantów *mosaic* dochodzi do zmian w poziomie ekspresji genu *Atox1*. Kolejnym celem obecnej pracy było sprawdzenie, czy w nerkach myszy o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic*, stosowanie terapii chlorkiem miedzi (II) powoduje relokalizację białka ATOX1 z cytoplazmy do jądra komórkowego, co mogłoby być przyczyną nadmiernej proliferacji komórek kanalików nerkowych.
4. Białko CCS jest metalochaperonem, który w komórkach transportuje, a następnie pośredniczy we włączaniu jonów miedzi do nieaktywnej formy SOD1, dzięki czemu enzym ten jest aktywowany i może pełnić funkcję komórkowego antyoksydanta (Casareno i wsp. 1998, Culotta i wsp. 1997, Rae i wsp. 1999). Jak wykazały wyniki wcześniejszych badań ekspresja białka CCS jest zależna od zawartości miedzi w

komórce (Bertinato i L'Abbé 2003, Bertinato i wsp. 2010, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004). W obecnej pracy starano się wykazać, jak podawanie iniekcji chlorku miedzi (II) wpływa na ekspresję genu i białka *Ccs/CCS* w nerkach u samców mutantów *mosaic* oraz myszy o genotypie dzikim. Badano również, czy zmiany poziomu ekspresji białka CCS prowadzą do zmiany poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach u badanych grup myszy.

5. Wykaz stosowanych skrótów

°C – stopnie Celcjusza

μl – mikrolitr

Å – angstrom

bp – ang. *base pair*; para zasad

Cu⁺ - jon (kation) jednowartościowy miedzi

Cu²⁺ - jon (kation) dwuwartościowy miedzi

CuCl₂ – 0,01% roztwór chlorku miedzi (II) przygotowany w roztworze soli fizjologicznej

h - godzina

H₂O₂ – nadtlenek wodoru

g – gram

M – stężenie molowe

mA - miliamper

mg - miligram

min – minuta

ml – mililitr

mM – stężenie milimolowe

ng - nanogram

OH⁻ - jon hydroksylowy

OH[•] - rodnik hydroksylowy

rpm – ang. *revolutions per minute*; obroty na minutę

q – długie ramię chromosomu

SD – odchylenie standardowe

sek – sekunda

V - wolt

6. Materiały i metody

6. 1. Odczynniki, materiały oraz aparatura laboratoryjna wykorzystane w trakcie prowadzonych badań

ODCZYNNIK/ZWIĄZEK CHEMICZNY	FIRMA
2-butanol	Sigma-Aldrich
Agaroza	Sigma-Aldrich
Akrylamid	Merck
Antyproteazy	Sigma-Aldrich
APS; nadsiarczan amonu	Sigma-Aldrich
Barwnik Midori Green	Nippon Genetics
Beta-merkaptioetanol	Sigma-Aldrich
Błękit bromofenolowy	Sigma-Aldrich
Bufor do reakcji PCR	Thermo Fisher Scientific
Bufor obciążający	VWR
Bufor TBE Tris Kwas borowy EDTA	BioShop
Bufor Tris-glicyna 10x stężony bufor	Syngen
BSA; roztwór albumin bydlęcej (ang. <i>Bovine Serum Albumin</i>)	ICN Biomedicals
DEPC (ang. <i>diethyl pyrocarbonate</i>)	BioShop
dNTP; roztwór deoksynukleotydów	Sigma-Aldrich
EDTA; kwas wersenowy (ang. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)	Sigma-Aldrich
Etanol	POCH
Fosforan potasy	POL-AURA
Gliceryna	Sigma-Aldrich
Histydyna	Merck
Krioprotektant do zatapiania tkanek	Thermo Fisher Scientific

Kwas azotowy (V)	Merck
Medium Vectashield z DAPI	Vector Laboratories
Marker wielkościowy DNA 100 bp	Thermo Fisher Scientific
Metanol	POCH
MgCl ₂ ; chlorek magnezu	Thermo Fisher Scientific
NaCl; chlorek sodu	Biomus
NBT; błękit nitrotetrazolowy	POL-AURA
Odczynnik Bradforda	Biorad
PBS; buforowana fosforanem sól fizjologiczna	BioShop
PMSF (ang. <i>phenylmethanesulfonyl fluoride</i>)	Sigma-Aldrich
Polimeraza Taq	Thermo Fisher Scientific
Ryboflawina	Sigma-Aldrich
Sacharoza	BioShop
SDS; sodium dodecyl sulfate	Sigma-Aldrich
Siarczan chromu (III) potasu	Merck
Sterylna woda	Sigma-Aldrich
SYBR Green I	Applied Biosystems
TEMED; N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	Merck
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Tween 20	Sigma-Aldrich
Żelatyna	Sigma-Aldrich
Zestaw substratów dla HRP (ang. horseradish peroxidase)	Advansta
Zestaw do izolacji RNA Nucleo Spin RNA	MACHEREY-NAGEL
Zestaw do odwrotnej transkrypcji High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems

Tab. 1. Odczynniki i związki chemiczne.

NACZYNIA I MATERIAŁY	FIRMA
Bibuła Whatmana	GE Whatman
Kasety do reakcji Western blot	Thermo Fisher Scientific
Kliska fotograficzna X-ray film	Thermo Fisher Scientific
Końcówki do pipet	Eppendorf
Kuwety spektrofotometryczne	Bionovo
Membrana PVDF	Thermo Fisher Scientific
Narzędzia do sekcji	-
Pipety	PZ HTL
Płytki 96 dołkowe do reakcji Real Time PCR	Applied Biosystems
Probówki do PCR	Bionovo
Probówki wolne od DNaz i Rnaz	Neptune
Szkiełka nakrywkowe	Heinz Herenz
Szkiełka podstawowe	Heinz Herenz
Tłuczki do homogenizacji tkanek	Bionovo
PAP-pen	IHC WORLD

Tab. 2. Naczynia i materiały laboratoryjne.

APARATURA LABORATORYJNA	FIRMA
Aparat do elektroforezy białek XCell SureLock Mini-Cell	Thermo Fisher Scientific
Aparat do elektroforezy kwasów nukleinowych	A-biotech
Autoklaw	Adverti
Blok grzewczy	Rocker
Homogenizator FastPrep-24	MP Biomedicals
Kriostat	Leica CM 1850 UV
Mikroskop konfokalny	ZEISS Axio Observer Z1
Mikrotom	Reichert-Jung
Spektrofotometr do pomiarów białka	Beckman DU-68
Spektrofotometr do pomiarów RNA i DNA	NanoDrop 2000 Thermo Fisher Scientific
Spektrofotometr	Beckman DU-68
Spektrometr absorpcji atomowej	Perkin-Elmer Aanalyst-800
Termocykler do PCR	Sensoquest
Termocykler do real time PCR	StepOnePlus Real-Time PCR Thermo Fisher Scientific
Transiluminator	Herolab
Ultrawirówka	Beckman Coulter Optima XPN
Waga laboratoryjna	RADWAG
Wirówka laboratoryjna	Adverti
Wstrząsarka	V-1 Plus Biosan

Tab. 3. Aparatura laboratoryjna.

6. 2. Materiał biologiczny

6. 2. 1. Zwierzęta

Zwierzęta doświadczalne użyte w obecnej pracy pochodziły z hodowli Zakładu Genetyki i Ewolucjonizmu, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego. Były to myszy pochodzące z niekrewniaczego stada *outbred*. Zwierzęta hodowane były w warunkach stałej temperatury ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), przy stałym fotoperiodzie (12h/12h), karmione paszą Labofeed H (Kcynia), natomiast do picia dostawały wodę (*ad libitum*).

Badania zostały przeprowadzone za zgodą I Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (nr 137/2015) oraz II Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Krakowie (nr 180/2016).

Do doświadczeń wykorzystano samce o genotypie dzikim, które stanowiły grupę kontrolną oraz samce mutanty *mosaic*. Samce mutanty *mosaic* (ms/-) uzyskiwano z kojarzenia heterozygotycznych samic (ms/+) z samcami o genotypie dzikim (+/-). W miotach pochodzących z takiego kojarzenia rodziły się samce mutanty *mosaic*, które można było rozpoznać już w pierwszej dobie po urodzeniu, po charakterystycznie skreślonych wibrysach. W późniejszym okresie samce te można było również rozpoznać po jednolicie rozjaśnionej barwie sierści. W 2 dniu życia oznaczano płeć osobników w miocie na podstawie oceny odległości anogenitalnej. Samce o genotypie dzikim posiadają proste wibrysy, natomiast w późniejszym czasie ich sierść ma kolor jednolicie szary. Heterozygotyczne samice charakteryzują się występowaniem nieregularnych jasnych i ciemnych plam na sierści, co jest zgodne z naturą defektu genetycznego, gdyż zmutowany gen *Atp7a* zlokalizowany jest na chromosomie X.

Mutacja *mosaic* jest letalna dla hemizygotycznych samców, które umierają pomiędzy 15, a 17 dniem życia. Podanie związków miedzi z pominięciem bariery jelitowej znosi letalny efekt mutacji, a długość życia osobników poddanych terapii może wynosić nawet 12 miesięcy (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2017, Styra 1977). W obecnej pracy w celu sprawdzenia, jaki efekt ma stosowanie takiej terapii na ekspresję genów i białek związanych z metabolizmem miedzi w organach samców mutantów *mosaic*, samce mutanty poddano terapii polegającej na podskórnym oraz dootrzewnowym podaniu roztworu chlorku miedzi (II). Terapeutyczne podanie związku miedzi rozpoczęto już w 2 dniu życia mutantów *mosaic*, a terapię kontynuowano do 44 dnia życia. Równolegle roztwór chlorku miedzi (II) podawano pochodzącym z tych samych miotów samcom o genotypie dzikim.

6. 2. 2. Procedura podawania chlorku miedzi (II) zwierzętom doświadczalnym

Począwszy od 2 dnia życia samcom mutantom *mosaic* oraz samcom o genotypie dzikim podawano, w odstępach 48h, iniekcje 0,01% roztworu CuCl_2 przygotowanego w roztworze soli fizjologicznej (Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2017). Terapię kontynuowano aż do 44 dnia życia myszy. Trzy pierwsze dawki stanowiły podskórne iniekcje roztworu CuCl_2 w dawce 25 μl , a następne cztery podskórne dawki podawane były w postaci

30 µl roztworu CuCl₂. Począwszy od 16 do 44 dnia życia zwierzęta doświadczalne otrzymywały 50 µl roztworu CuCl₂ w iniekcji dootrzewnowej.

6. 2. 3. Grupy badane

W obecnej pracy analizowano wpływ podawania CuCl₂ na ekspresję genów i białek związanych z metabolizmem miedzi w nerkach u trzech grup wiekowych myszy – osobników 14-dniowych, 46-dniowych oraz 6 miesięcznych (około 180-dniowych).

6. 2. 3. 1. Zwierzęta 14-dniowe

Zdecydowano się przeprowadzić badania na myszach 14-dniowych, gdyż w grupie tej możliwa jeszcze była analiza ekspresji genów i białek u mutantów *mosaic*, które nie były poddane terapii CuCl₂. Umożliwiło to porównanie otrzymanych wyników przede wszystkim do wyników otrzymanych w grupie mutantów *mosaic*, które otrzymywały iniekcję począwszy od 2 dnia życia. Analiza 14-dniowych myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ pozwoliła zanalizować efekt podawania chlorku miedzi (II) we wczesnym okresie życia postnatalnego.

Grupa badanych, młodych, 14-dniowych osobników składała się z:

- 14-dniowych samców o genotypie dzikim,
- 14-dniowych samców mutantów *mosaic*, które nie były poddane terapii CuCl₂,
- 14-dniowych samców o genotypie dzikim, które otrzymywały suplementację CuCl₂,
- 14-dniowych samców mutantów *mosaic*, które poddane były terapii CuCl₂.

Oznaczenia stosowane dla poszczególnych grup badanych myszy 14-dniowych podano w Tabeli 4 (Tab. 4).

Grupa myszy 14-dniowych				
GENOTYP	GENOTYP DZIKI (KONTROLA)	MUTANT <i>mosaic</i> (<i>Atp7a^{MO-MS}</i>)	GENOTYP DZIKI suplementacja CuCl ₂	MUTANT <i>mosaic</i> (<i>Atp7a^{MO-MS}</i>) CuCl ₂
OZNACZENIE	+/- (14)	ms/- (14)	+/- Cu (14)	ms/- Cu (14)

Tab. 4. Zwierzęta 14-dniowe - wyszczególniono grupy badane oraz przedstawiono oznaczenia dla poszczególnych grup myszy 14-dniowych zastosowane w dalszych rozdziałach pracy.

6. 2. 3. 2. Zwierzęta 46-dniowe

Analizując grupę zwierząt 46-dniowych możliwe było określenie, jaki był efekt ciągłego podawania chlorku miedzi (II) przez okres 44 dni na ekspresję genów i białek związanych z metabolizmem miedzi w nerkach u samców mutantów *mosaic* i u myszy o genotypie dzikim.

Badana grupa 46-dniowych osobników składała się z:

- 46-dniowych samców o genotypie dzikim,
- 46-dniowych samców o genotypie dzikim, które otrzymywały suplementację CuCl₂,
- 46-dniowych samców mutantów *mosaic*, które poddane były terapii CuCl₂.

Oznaczenia stosowane dla poszczególnych grup badanych myszy 46-dniowych podano w Tabeli 5 (Tab. 5).

Grupa myszy 46-dniowych			
GENOTYP	GENOTYP DZIKI (KONTROLA)	GENOTYP DZIKI suplementacja CuCl ₂	MUTANT <i>mosaic</i> (<i>Atp7a^{MO-MS}</i>) CuCl ₂
OZNACZENIE	+/- (46)	+/- Cu (46)	ms/- Cu (46)

Tab. 5. Zwierzęta 46-dniowe - wyszczególniono grupy badane oraz przedstawiono oznaczenia dla poszczególnych grup myszy 46-dniowych zastosowane w dalszych rozdziałach pracy.

6. 2. 3. 3. Zwierzęta 6 miesięczne (około 180-dniowe)

Myszy 6 miesięczne zostały uśmiercono dopiero po upływie 4,5 miesiąca od dnia otrzymania ostatniej iniekcji CuCl_2 w 44 dniu życia. Wybór tej grupy pozwolił określić długotrwałe efekty stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) oraz w jaki sposób wpływa ona na ekspresję badanych genów i białek w nerkach samców mutantów *mosaic* oraz myszy o genotypie dzikim.

Badana grupa 6 miesięcznych osobników składała się z:

- 6 miesięcznych samców o genotypie dzikim,
- 6 miesięcznych samców o genotypie dzikim, które otrzymywały suplementację CuCl_2 ,
- 6 miesięcznych samców mutantów *mosaic*, które poddane były terapii CuCl_2 .

Oznaczenia stosowane dla poszczególnych grup badanych myszy 6 miesięcznych podano w Tabeli 6 (Tab. 6).

Grupa myszy 6 miesięcznych			
GENOTYP	GENOTYP DZIKI (KONTROLA)	GENOTYP DZIKI suplementacja CuCl_2	MUTANT <i>mosaic</i> (<i>Atp7a^{mo-ms}</i>) CuCl_2
OZNACZENIE	+/- (6)	+/-Cu(6)	ms/-Cu(6)

Tab. 6. Zwierzęta 6 miesięczne - wyszczególniono grupy badane oraz przedstawiono oznaczenia dla poszczególnych grup myszy 6 miesięcznych zastosowane w dalszych rozdziałach pracy.

6. 2. 4. Oznaczenie masy ciała badanych myszy

W celu oznaczenia masy ciała użyte w doświadczeniu samce należące do wszystkich grup badanych ważono na wadze laboratoryjnej każdorazowo przed podaniem iniekcji począwszy od 2 do 44 dnia życia. W celu oznaczenia masy ciała osobników 46-dniowych oraz 6 miesięcznych myszy były ważone bezpośrednio przed uśmierceniem.

6. 2. 5. Uśmiercanie zwierząt

Wszystkie zwierzęta z badanych grup (osobniki 14-dniowe, 46-dniowe, 6 miesięczne) zostały uśmiercone poprzez dyslokację kręgów szyjnych. Następnie organy preparowano i odpowiednio utrwalano, bądź zamrażano w temperaturze -20°C lub po uprzednim zamrożeniu w ciekłym azocie, przechowywano w temperaturze -80°C.

6. 3. Zastosowane metody

- Oznaczenie zawartości miedzi w organach u wszystkich grup badanych myszy przeprowadzono metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej (ASA; ang. *Atomic Absorption Spectrometry*).
- Zmiany poziomu ekspresji genów kodujących transportery błonowe (*Ctrl* i *Ctrl2*) oraz kodujących metalochaperony (*Atox1* i *Ccs*) w nerkach u wszystkich grup badanych myszy, analizowano z użyciem metody PCR w czasie rzeczywistym (real time PCR).
- Analizę ekspresji białek CTR1, CCS oraz SOD1 w nerkach myszy mutantów *mosaic* i osobników o genotypie dzikim przeprowadzono za pomocą metody Western blot.
- Metodą immunofluorescencyjną badano wewnątrzkomórkową lokalizację białek CTR1 i ATOX1 w nerkach badanych samców pochodzących z wszystkich grup badanych.
- Aktywność białka SOD1 badano metodą rozdziału elektroforetycznego białka w żelu poliakrylamidowym oraz przy zastosowaniu reakcji ze związkami Nitroblue Tetrazolium oraz ryboflawiną.

6. 3. 1. Oznaczenie zawartości miedzi w tkankach

Pomiar zawartości miedzi zarówno w nerkach, jak i w wątrobie pochodzących od osobników z wszystkich badanych grup wykonano za pomocą metody absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA), która opiera się na wykorzystaniu zjawiska absorpcji promieniowania emitowanego przez wzbudzone atomy badanego pierwiastka. Analizy tego pomiaru zostały wykonane przez firmę zewnętrzną.

Od uśmierconych zwierząt pobierano organy, które następnie zważono w celu określenia ich mokrej masy. Tkanki następnie zamrożono i przechowywano w temperaturze

-20°C do czasu przeprowadzenia dalszych reakcji. Organy zmineralizowano na płytce grzewczej w 2 ml spektralnie czystego kwasu azotowego (V) w temperaturze 130°C. Następnie, po odparowaniu kwasu, do osadu dodawano wodę dejonizowaną do objętości 10 ml. Pomiary zawartości miedzi w badanych próbkach wykonywane były z wykorzystaniem spektrometru absorpcji atomowej Perkin-Elmer Analyst-800. Równolegle, wykonano również próby negatywne, gdzie poszczególne etapy reakcji były identyczne, jak w przypadku mineralizacji badanych próbek, z tą jednak różnicą, że w probówkach nie znajdowały się tkanki, a jedynie kwas azotowy (V). W trakcie analiz wykonano również próby odniesienia z wykorzystaniem 100mg materiału odniesienia (Promochem, Niemcy). Równocześnie wykazano poziom czułości wykonywanej reakcji na próbkach wody dejonizowanej.

6. 3. 2. Analiza ekspresji wybranych genów związanych z metabolizmem miedzi

6. 3. 2. 1. Izolacja RNA z organów

Izolacja całkowitego RNA z nerek osobników należących do poszczególnych grup badanych została przeprowadzona przy użyciu zestawu NucleoSpin RNA II. Przed rozpoczęciem reakcji tłuczki, które są używane do homogenizacji tkanek zostały zanurzone w 0,1% roztworze DEPC na czas 24 h, w celu zahamowania działania rubonukleaz (RNaz), które degradują cząsteczki RNA. Po upływie tego czasu tłuczki zostały wyautoklawowane, w celu inaktywacji DEPC.

Każdorazowo do probówki wolnej od DNaz i RNaz zawierającej około 30mg tkanki dodano 350µl buforu lizującego RA1 pochodzącego z zestawu oraz 3,5µl β-merkaptotetanolu. Następnie tkankę poddano procesowi homogenizacji przy użyciu wcześniej przygotowanych tłuczków do uzyskania jednorodnego lizatu. Lizat przeniesiono na kolumnę filtracyjną z zestawu, aby wstępnie oczyścić homogenat. Całość wirowano przez 1 min z prędkością 11 000g. Kolejno do przesączu dodawano 350µl 70% etanolu wolnego od DNaz i RNaz, a następnie dokładnie wymieszano. Zawiesinę przenoszono na kolumnę z zestawu zawierającą złożę krzemionkowe i zwirowano wraz z zawartością przez 1 min z prędkością 11 000 g. Następnie w celu odsolenia membrany na kolumnę nanoszono 350µl buforu MBD (ang. *Membrane Desalting Buffer*) z zestawu, a całość ponownie wirowano przez 2 min z prędkością 11 000g. Kolejnym krokiem było naniesienie na środek suchej membrany 95µl roztworu aktywowanej DNazy (otrzymanej poprzez dodanie do nieaktywnej DNazy buforu aktywującego DNazę pochodzącego z zestawu). Całość inkubowano przez 15 min w

temperaturze pokojowej. W tym czasie następowało strawienie cząsteczek DNA przez DNazę. Następnie na kolumnę naniesiono 200µl buforu płuczącego RA2 inaktywującego DNazę z zestawu i wirowano przez 1 min z prędkością 11 000 g. Kolumnę przeniesiono na nową probówkę wolną od DNaz i RNaz pochodzącą z zestawu, a następnie na kolumnę nałożono 600µl buforu RA3 i ponownie wirowano przez 1 min z prędkością 11 000g. Kolumnę następnie przepłukano buforem RA3 pochodzącym z zestawu w objętości 250µl i wirowano przez 2 min z prędkością 11 000g, aż do całkowitego osuszenia membrany. Ostatnim krokiem było umieszczenie kolumny na pochodzącej z zestawu, wolnej od DNaz i RNaz, probówce o objętości 1,5 ml. Na membranę naniesiono 60µl wolnej od RNaz wody pochodzącej z zestawu. Całość wirowano przez 1 min z prędkością 11 000g. W celu poprawienia wydajności w odzyskiwaniu RNA, zebrany w probówce przesącz jeszcze raz przeniesiono na membranę i ponownie wirowano przez 1 min z prędkością 11 000 g. Tak wyizolowane RNA przechowywano w temperaturze -80°C.

6. 3. 2. 2. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Wyizolowane RNA wykorzystano podczas reakcji odwrotnej transkrypcji w celu otrzymania cDNA. Do reakcji odwrotnej transkrypcji używano 2500ng RNA. Objętość RNA zawierająca odpowiednią jego ilość, która była potrzebna do reakcji, obliczano ze wzoru 1 (Wzór 1).

$$x = \frac{2\,500 \text{ ng RNA}}{y}$$

Wzór 1. Sposób obliczania objętości RNA potrzebnej do reakcji odwrotnej transkrypcji, gdzie: x- objętość RNA [µl] potrzebna do syntezy cDNA; y – stężenie RNA [ng] w 1µl otrzymanego podczas pomiaru stężenia RNA.

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono z użyciem zestawu High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Do probówki o objętości 1,5 ml wolnej od DNaz i RNaz dodawano odczynniki pochodzące z zestawu w objętościach podanych w tabeli 7 (Tab. 7).

ODCZYNNIK	OBJĘTOŚĆ [μl]
Bufor 10x stężony	5
Random primers (startery)	5
Mieszanina dNTP	2
Odwrotna transkryptaza (50 U/ml)	2,5
RNA (objętość x wyliczona ze wzoru 1)	X
Woda wolna od DNaz i RNaz (z zestawu do izolacji RNA NucleoSpin)	do objętości 50 ml

Tab. 7. Mieszanina reakcyjna użyta do reakcji odwrotnej transkrypcji (ilość podana na 1 próbę).

Tak przygotowane próbki zostały umieszczone w bloku grzewczym w temperaturze 25°C na czas 10 min, a następnie były przeniesione do następnego bloku grzewczego o temperaturze 37°C na okres 2h. W tym czasie zachodziła właściwa reakcja syntezy cDNA. Reakcję zakończono poprzez inaktywację odwrotnej transkryptazy umieszczając próbki w termobloku o temperaturze 85°C przez 1 min. Tak przygotowane próbki z cDNA (oznaczone dalej jako RT+) przechowywano w -20°C. W tym samym czasie przygotowano również próbki, które nie zawierały enzymu odwrotnej transkryptazy (oznaczone dalej jako RT-). Sposób przygotowania próbek RT- był identyczny do przygotowania próbek RT+, jednak do próbek dodawano wodę wolną od RNaz z zestawu NucleoSpin zamiast enzymu odwrotnej transkryptazy. Próbki RT- stanowiły kontrolę czystości izolacji RNA. Brak produktu reakcji PCR w próbkach RT- potwierdzał, że podczas izolacji RNA próbki nie były zanieczyszczone genomowym DNA. Zarówno próbki RT+, jak i RT- były przechowywane w -20°C.

6. 3. 2. 3. Reakcja łańcuchowa polimerazy PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

Techniką, która pozwala na zwielokrotnienie ilości DNA jest łańcuchowa reakcja polimerazy. Podczas tej reakcji następuje cykliczne powtarzanie się etapów denaturacji cząsteczek DNA, przyłączanie starterów, a następnie synteza nici DNA, dzięki czemu materiał genetyczny zostaje wielokrotnie powielony w stosunkowo krótkim czasie.

W celu sprawdzenia specyficzności użytych starterów oraz wykazania, że w nerkach pochodzących od myszy wszystkich badanych grup zachodzi ekspresja badanych genów

przeprowadzono reakcję PCR. Dzięki tej reakcji zamplifikowane zostało wyłącznie cDNA znajdujące się w próbkach RT+. Jednocześnie reakcja ta pozwoliła również wykazać, że badane próbki nie były zanieczyszczone genomowym DNA, które mogło pozostać w próbce jako niezdegradowane przez DNazę podczas reakcji izolacji RNA. W ten sposób przetestowano pary starterów dla następujących genów: *Ctrl*, *Ctrl2*, *Atox1* oraz *Ccs*. Użyte do amplifikacji wymienionych genów pary starterów przygotowane zostały przez firmę Genomed. W tabeli 8 zostały podane sekwencje starterów dla poszczególnych genów użytych podczas reakcji PCR oraz późniejszych reakcji real time PCR (Tab. 8).

Nazwa genu	Sekwencja starterów	Starter
<i>Ctrl</i>	5'-GACAACATTACCATGCCACCTCACCA-3'	<i>Forward starter</i>
	5'-GTAAAAACACTGCCACGAAGGCTCCA-3'	<i>Reverse starter</i>
<i>Ctrl2</i>	5'-CTCTTTGATTCTGGAGGGTCCACAG-3'	<i>Forward starter</i>
	5'-TAGAATCCTGGTCTGGTCCCAAGATG-3'	<i>Reverse starter</i>
<i>Atox1</i>	5'-ACAGGAAAGGCTGTTTCCTACCTTGC-3'	<i>Forward starter</i>
	5'-GACTGGACTGAGCAGTTGGTGTTCG-3'	<i>Reverse starter</i>
<i>Ccs</i>	5'-GTGCATCAGTATGGGGACCTTACGAG-3'	<i>Forward starter</i>
	5'-TCCCACACCTTCAGCTGTTTATCCTC-3'	<i>Reverse starter</i>
<i>18S</i>	5'-CTGAGAAACGGCTACCACATC-3'	<i>Forward starter</i>
	5'-CGCTCCCAAGATCCAACACTAC-3'	<i>Reverse starter</i>

Tab. 8. Sekwencje starterów użyte do reakcji PCR oraz reakcji real time PCR.

Reakcję PCR przeprowadzono według następującej procedury:

Do każdej cienkościennej probówki reakcyjnej o pojemności 0,2ml używanej do reakcji PCR dodano odczynniki w objętościach, które zostały zestawione w tabeli 9 (Tab. 9).

ODCZYNNIK	OBJĘTOŚĆ [μl]
Bufor 10x stężony	2
MgCl ₂	0,8
Woda do reakcji PCR	13,4
<i>Forward</i> starter	0,6
<i>Reverse</i> starter	0,6
Mieszanina dNTP	0,6
Polimeraza Taq (1U/ml)	1
Matryca (cDNA)	1

Tab. 9. Mieszanina reakcyjna użyta do reakcji łańcuchowej polimerazy, PCR (ilość podana na 1 próbę).

Przygotowano również próbę negatywną, która wskazuje na brak zanieczyszczenia odczynników i wody używanych do reakcji. W tym celu do próbki reakcyjnej dodano wszystkie wymienione w tabeli 9 odczynniki, ale zamiast matrycy cDNA dodano 1μl wody wolnej od RNaz i DNaz (Tab. 9). Reakcję PCR dla poszczególnych genów przeprowadzono w 35 cyklach. Warunki termiczne reakcji przedstawiono w tabeli 10 (Tab. 10). Produkty reakcji PCR rozdzielono na żelu agarozowym.

ETAP REAKCJI	TEMPERATURA	CZAS	
Denaturacja wstępna	94°C	5 min	x 35 cykli
Właściwa denaturacja	94°C	30 sek	
Przylączenie starterów (annealing)	60°C	20 sek	
Wydłużanie starterów (elongacja)	72°C	45 sek	
Wydłużanie końcowe	72°C	10 min	
Zakończenie reakcji	4°C	-	∞

Tab. 10. Warunki termiczne reakcji łańcuchowej polimerazy, PCR.

6. 3. 2. 4. Elektroforeza w żelu agarozowym

Przygotowanie żelu:

Do uwidocznienia produktów reakcji PCR wykorzystano elektroforezę w żelu agarozowym. W tym celu przygotowano 1,2% żel zawierający 1,2g agarozy oraz 100 ml 0,5x stężonego buforu TBE (0,45M Tris, 0,45M kwas boranowy, 1mM EDTA). Roztwór podgrzano do momentu całkowitego rozpuszczenia się agarozy. Następnie do roztworu

dodano 3µl Midori Green. Całość dokładnie wymieszano. Po ostudzeniu żel wylano na specjalną płytkę do elektroforezy z ogranicznikami oraz z zamontowanymi grzebieniami. Po zastygnięciu żelu, usunięto grzebień, a płytkę wraz z żelem umieszczono w komorze aparatu do elektroforezy wypełnionym 0,5x stężonym buforem TBE.

Elektroforeza:

Do każdej z próbek po reakcji PCR dodano po 3µl buforu obciążającego (200mM Tris-HCl, 6% SDS, 15% gliceryna, 0,05% błękit bromofenolowy, 0,1% 2-merkaptotanol). Następnie do pierwszego dołka w żelu agarozowym dodano 3µl markera wielkościowego (100bp), a do kolejnych dołków nałożono po 20 µl każdej z badanych próbek wraz z buforem obciążającym. Elektroforezę prowadzono pod stałym napięciem 90V do momentu rozdzielania się produktów reakcji w żelu. Po zakończeniu elektroforezy żel umieszczono na płycie transiluminatora i wykonano zdjęcie.

6. 3. 2. 5. Badanie poziomu ekspresji genów metodą real time PCR (PCR w czasie rzeczywistym; ang. *real time PCR*)

Wykonując reakcję PCR możemy stwierdzić, czy w badanej próbce zachodzi ekspresja badanego genu. Natomiast ogromną zaletą reakcji PCR w czasie rzeczywistym jest możliwość analizy przyrostu badanego produktu z każdym kolejnym cyklem. Reakcja real time PCR opiera się na analizie pomiaru zmian fluorescencji w próbce. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu znakowanych fluorescencyjnie sond, starterów lub fluorochromów. W obecnej pracy użytym fluorochromem był SYBR Green I. Fluorochrom ten wiąże się specyficznie do cząsteczek dsDNA. Skutkiem tej interakcji jest silne wzmocnienie generowanego sygnału fluorescencji, które jest proporcjonalne do ilości matrycy w próbce.

W trakcie reakcji real time PCR zostały użyte pary starterów, które były wykorzystywane również w reakcji PCR (Tab. 8.). Ponadto względną ekspresję badanych genów *Ctrl*, *Ctrl2*, *Atox1* oraz *Ccs* oznaczono w odniesieniu do genu referencyjnego *18S* (Tab. 8). Gen *18S* jest jednym z genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*), który koduje u *Eukariota* 18S rRNA wchodzące w skład małej podjednostki rybosomu. Reakcję przeprowadzono w 96-dołkowych płytkach. W każdym dołku umieszczano odczynniki wymienione w tabeli 11 oraz 2µl badanej próbki cDNA (Tab. 11).

ODCZYNNIK	OBJĘTOŚĆ [μl]
Power SYBR Green PCR MasterMix	5
<i>Forward</i> starter	0,5
<i>Reverse</i> starter	0,5
Woda do reakcji PCR	2
Badane cDNA	2

Tab. 11. Mieszanina reakcyjna użyta do reakcji real time PCR (ilość podana na 1 próbę).

Do każdej reakcji real time PCR przygotowano również próby negatywne, gdzie zamiast 2μl cDNA dodano wodę wolną od RNaz i DNaz. Reakcję prowadzono w termocyklerze StepOnePlus w 40 cyklach, w warunkach termicznych przedstawionych w tabeli 12 (Tab. 12).

ETAP REAKCJI	TEMPERATURA	CZAS	
Denaturacja wstępna	95°C	10 min	
Właściwa denaturacja	95°C	15 sek	x 40 cykli
Przylączenie starterów (annealing)	60°C	60 sek	
	95°C	15 sek	
Krzywa topnienia	60°C	60 sek	
	95°C	15 sek	

Tab. 12. Warunki termiczne reakcji real time PCR.

Poziom ekspresji badanych genów w nerkach pochodzących od myszy z poszczególnych grup badanych określono wykorzystując metodę $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Pomiar ekspresji mRNA genów w badanych tkankach pochodzących od myszy z różnych grup wiekowych wyrażono w jednostkach umownych (au).

6. 3. 3. Analiza statystyczna

Analizy statystyczne przeprowadzono dla każdej z badanych grup wiekowych za pomocą programu statystycznego Prism GraphPad 7, celem określenia różnic statystycznie

istotnych pomiędzy badanymi grupami. W celu sprawdzenia, czy analizowane dane są zbliżone do rozkładu normalnego wykonano test Shapiro-Wilka:

- przy rozkładzie normalnym danych – przeprowadzono analizy statystyczne ANOVA dwuczynnikowa; *post hoc* test Tukeya
- przy rozkładzie nienormalnym danych – przeprowadzono analizy statystyczne ANOVA Kruskala-Wallisa; *post hoc* test Dunn.

6. 3. 4. Badanie ekspresji białek z wykorzystaniem reakcji immunofluorescencji

6. 3. 4. 1. Przygotowanie szkiełek podstawowych

Przygotowano następujący roztwór, którym pokryto szkiełka podstawowe: 0,5g żelatyny rozpuszczono w 40 ml zimnej wody destylowanej, a następnie mieszano na mieszadle magnetycznym z włączonym podgrzewaniem do momentu całkowitego rozpuszczenia się żelatyny. Tak sporządzony roztwór ochłodzono do temperatury pokojowej. Równocześnie przygotowano roztwór 0,05g $\text{KCr}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ w 10 ml wody destylowanej. Połączono przygotowane roztwory i mieszano ze sobą przez 1 min, a powstały roztwór przefiltrowano przez sącze z bibuły filtracyjnej. Szkiełka podstawowe odtłuszczono poprzez płukanie w 70% roztworze etanolu, a następnie dokładnie osuszono. Szkiełka zanurzano w roztworze żelatyny z siarczanem chromowo-potasowym i suszono w temperaturze pokojowej przez 10 min, a następnie w temperaturze 37°C przez 12h.

6. 3. 4. 2. Przygotowanie skrawków mrożeniowych i przeprowadzenie reakcji immunofluorescencyjnej w celu zbadania komórkowej lokalizacji białek CTR1 oraz ATOX1

Tkanki utrwalono w 4% roztworze paraformaldehydu w PBS (4% PFA w PBS) w temperaturze +4°C przez 24 h. Po tym czasie tkanki płukano w PBS dwa razy, każdorazowo po 30 min w temperaturze +4°C. Kolejnym etapem było przepajanie tkanek w 12,5% wodnym roztworze sacharozy przez 2h w temperaturze +4°C, a następnie w 25% wodnym roztworze sacharozy w temperaturze +4°C przez okres 24h. Przepojone tkanki otaczano krioprotektantem, zamrażano w ciekłym azocie i umieszczano na holderze do kriostatu. Tkanki krojono przy użyciu kriostatu Leica CM 1850 UV na skrawki o grubości 20µm, które następnie umieszczano na szkiełkach podstawowych pokrytych żelatyną. Preparaty przechowywano w temperaturze -20°C.

Reakcję immunofluorescencji pozwalającą na zbadanie wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek CTR1 oraz ATOX1 przeprowadzono na preparatach mrożeniowych z nerek pochodzących od myszy wszystkich grup badanych. Skrawki umieszczone na szkiełkach podstawowych otoczono wodoodpornym PAP Pen'em. Następnie szkiełka umieszczono w komorze mokrej. Każdorazowo na preparat naniesiono 100µl PBS i inkubowano przez 10 min. Następnie nadmiar PBS usunięto, a na preparat naniesiono 100µl 0,1% roztworu Triton X-100 w PBS. Próbkę inkubowano przez 20 min, w celu przeprowadzenia permeabilizacji błon komórkowych. Nadmiar płynu usunięto, a na skrawki w celu zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciała, nałożono 3% roztwór albuminy bydlęcej (BSA) w PBS. Po upływie 2h usunięto roztwór BSA, a na skrawki naniesiono roztwór I-rzędowego przeciwciała przygotowanego w roztworze 3% BSA w PBS. Stężenia poszczególnych przeciwciał I-rzędowych użytych w reakcji immunolokalizacji przedstawiono w Tabeli 13 (Tab. 13).

W przypadku reakcji wykrywającej białko CTR1 użyto przeciwciała I-rzędowego skierowanego przeciwko białku CTR1 (Tab. 13). Z kolei w przypadku reakcji immunolokalizacji białka ATOX1 użyto I-rzędowego przeciwciała skierowanego przeciwko białku ATOX1 (Tab. 13). Skrawki pokryte roztworami odpowiednich przeciwciał I-rzędowych inkubowano przez całą noc w komorze mokrej, w temperaturze pokojowej. Następnie usuwano niezwiązane z antygenem I-rzędowe przeciwciała poprzez płukanie roztworem 0,1% Triton X-100 w PBS. Preparaty płukano 7 razy po 6 min. Następnie na skrawki naniesiono odpowiedni roztwór II-rzędowego przeciwciała przygotowanego w roztworze 3% BSA w PBS i inkubowano przez 1,5h w temperaturze pokojowej. Stężenia poszczególnych przeciwciał II-rzędowych używanych w reakcji immunolokalizacji podano w Tabeli 14 (Tab. 14). W przypadku reakcji immunolokalizacji wykrywającej białko CTR1 użyto przeciwciała II-rzędowego sprzężonego z fluorochromem Cy3, natomiast w przypadku reakcji immunolokalizacji białka ATOX1 użyto II-rzędowego przeciwciała sprzężonego z barwnikiem Alexa Fluor488 (Tab. 14). Począwszy od momentu nałożenia roztworu II-rzędowego przeciwciała na skrawki, wszystkie etapy reakcji immunofluorescencji przeprowadzano w warunkach, które chroniły preparaty przed dostępem do światła. Następnie preparaty płukano 7 razy po 5 min roztworem 0,1% Triton X-100 w PBS. W trakcie ostatniego płukania na skrawki naniesiono 100µl PBS i inkubowano przez 10 min. Preparaty zamykano wykorzystując medium Vectashield, które zawiera barwnik fluorescencyjny DAPI, silnie wiążący się do DNA w jądrach komórkowych.

Typ I-rzędowego przeciwciała	Rozcieńczenie	Typ	Immunizacja	Producent
Anty-CTR1	1:100	poliklonalne	królik	Novus Biologicals
Anty-ATOX1	1:20	poliklonalne	koza	Santa Cruz Biotechnology
Anty-AQP1	1:200	poliklonalne	koza	Santa Cruz Biotechnology
Anty-CCS	1:100	poliklonalne	królik	Santa Cruz Biotechnology
Anty-SOD1	1:2 000	poliklonalne	królik	Abcam
Anty-Aktyna	1:2 000	poliklonalne	koza	Santa Cruz Biotechnology

Tab. 13. Zestawienie przeciwciał I-rzędowych wykorzystanych do reakcji immunolokalizacji oraz reakcji Western blot.

Typ II-rzędowego przeciwciała	Rozcieńczenie	Typ	Immunizacja	Producent
Cy3-conjugated	1:500	anty-królik	koza	Jackson ImmunoResearch
Alexa Fluor 488-conjugated	1:500	anty-koza	osioł	Jackson ImmunoResearch

Tab. 14. Zestawienie przeciwciał II-rzędowych używanych do reakcji immunolokalizacji.

Jednocześnie w trakcie wykonywania reakcji immunofluorescencyjnej z przeciwciałami I-rzędowymi i II-rzędowymi wykonano również reakcję, która potwierdziła specyficzność wiązania II-rzędowego przeciwciała (próba negatywna). W tym celu na skrawki naniesiono roztwór 3% BSA w PBS niezawierającego I-rzędowego przeciwciała. Próby negatywne zostały wykonane na skrawkach nerek pochodzących od osobników wszystkich badanych grup wiekowych.

6. 3. 4. 3. Przeprowadzenie reakcji kolokalizacji białek CTR1 i AQP1

Akwaporyny są białkami, które w błonie komórkowej tworzą specyficzne kanały, uczestniczące w procesie transportu wody (Nielsen i wsp. 2007). Podstawową funkcjonalną jednostką nerki jest nefron, który składa się z trzech głównych odcinków, do których należy proksymalny (I-rzędowy) kanalik kręty, pętla Henlego (ramię zstępujące oraz ramię wstępujące pętli), a także dystalny (II-rzędowy) kanalik kręty. Wykazano, że transport wody w komórkach nefronu zachodzi przy udziale czterech różnych typów akwaporyn (AQP1, AQP2, AQP3, AQP4), jednak białka te przyjmują ekspresję w różnych częściach nefronu. Akwaporyna 1 (AQP1) zlokalizowana jest w początkowej części nefronu, czyli w obrębie proksymalnego

kanalika krętego oraz cienkiego ramienia zstępującego pętli Henlego (Nielsen i wsp. 2007). Białko to wykorzystywane jest również jako marker dla wymienionych odcinków nefronu (Smeets i wsp. 2013). W celu sprawdzenia czy białko CTR1 zlokalizowane jest w kanalikach proksymalnych nefronu wykonano reakcję kolokalizacji białka CTR1 oraz AQP1.

Reakcję kolokalizacji białek CTR1 i AQP1 przeprowadzono na skrawkach nerek pochodzących od zwierząt z dwóch skrajnych grup wiekowych badanych myszy, 14-dniowych (osobniki młode) oraz osobników 6 miesięcznych (osobniki dorosłe). Skrawki umieszczone na szkiełku podstawowym otoczono wodoodpornym PAP Penem, a następnie szkiełko umieszczono w komorze mokrej. Na preparaty naniesiono po 100µl PBS, a następnie inkubowano przez 10 min. Nadmiar PBS usunięto i zastąpiono 100µl 0,1% roztworem Triton X-100 w PBS przez 20 min. Po tym czasie nadmiar roztworu usunięto, a na skrawki naniesiono po 100µl 3% roztworu albuminy bydlęcej w PBS i inkubowano przez 2h w celu zablokowania niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciała. Kolejnym etapem było usunięcie roztworu BSA i naniesienie na skrawki roztworu, odpowiednio rozcieńczonego w 3% BSA w PBS pierwsze I-rzędowego przeciwciała skierowanego przeciwko białku AQP1 (Tab. 13). Skrawki inkubowano przez całą noc w komorze mokrej, w temperaturze pokojowej. Następnie, poprzez płukanie 7 razy po 6 min roztworem 0,1% Triton X-100 w PBS, usunięto I-rzędowe przeciwciała, które nie zostało związane z odpowiednim antygenem, po czym na preparaty nałożono drugie I-rzędowe przeciwciała skierowane przeciwko białku CTR1 odpowiednio rozcieńczone w 3% roztworze BSA w PBS (Tab. 13). Preparaty inkubowano ponownie przez całą noc w komorze mokrej, w temperaturze pokojowej. Niezwiązane przeciwciała I-rzędowe CTR1 zostało usunięte przez płukanie 7 razy po 6 min roztworem 0,1% Triton X-100 w PBS. Następnie na preparaty naniesiono roztwór mieszaniny uzyskany poprzez zmieszanie w stosunku 1:1 dwóch roztworów odpowiednich przeciwciał II-rzędowych przygotowanych w 3% BSA w PBS w stężeniach podanym w Tabeli 14 (Tab. 14). Preparaty ponownie inkubowano przez całą noc w komorze mokrej, w temperaturze pokojowej. Począwszy od momentu nałożenia roztworu mieszaniny przeciwciał II-rzędowych na preparaty, wszystkie etapy reakcji immunofluorescencji przeprowadzano w warunkach, które chroniły skrawki przed dostępem do światła. Kolejnym etapem reakcji było usunięcie niezwiązanych przeciwciał II-rzędowych poprzez płukanie roztworem 0,1% Triton X-100 w PBS (7 razy po 5 min). Następnie na skrawki naniesiono 100µl PBS i inkubowano przez 10 min. Preparaty zamknięto przy użyciu medium Vectashield. Jednocześnie w trakcie wykonywania powyższej reakcji immunofluorescencyjnej wykonano próby negatywne, które miały na celu potwierdzenie

specyficznego wiązania II-rzędowych przeciwciał. Procedura wykonywania tych preparatów była taka jak opisana powyżej, jednak zamiast roztworów I-rzędowych przeciwciał skierowanych przeciwko CTR1 oraz AQP1 użyto 3% BSA w PBS.

6. 3. 4. 4. Analiza mikroskopowa

Analizę preparatów wykonano przy użyciu mikroskopu konfokalnego (ZEISS Axio Observer Z1) oraz programu do analizy zdjęć ZEISS ZEN lite.

6. 3. 5. Reakcja Western blot

Analizę poziomu ekspresji białek CTR1, CCS oraz SOD1 przeprowadzono za pomocą metody Western blot. W tym celu wykonano ekstrakty białkowe z nerek pochodzących od osobników wszystkich badanych grup. W celu analizy poziomu ekspresji białka CTR1 przygotowano ekstrakty błonowe, natomiast w przypadku białek CCS oraz SOD1 ekstrakty cytoplazmatyczne. Tkanki użyte do przygotowania ekstraktów zważono, a następnie około 70mg materiału homogenizowano w buforze (histydyna 0.03M, sacharoza 0.25M, antyproteazy, 2mM EDTA, 2mM PMSF) przy pomocy homogenizatora FastPrep-24.

Homogenaty wirowano w warunkach 6000g/15min/4°C, a powstałe supernatanty poddano ultrawirowaniu przy prędkości 45000rpm/45min/4°C. Otrzymano supernatanty zawierające ekstrakty cytoplazmatyczne oraz osady zawierające frakcje błonowe. Ekstrakty cytoplazmatyczne przeniesiono do nowych probówek, natomiast pozostałe osady rozpuszczono w buforze użytym do homogenizacji próby.

Ilość białka w próbach określono za pomocą metody Bradforda. W tym celu 500µl odczynnika Bradforda umieszczono w kuwecie do pomiarów spektrofotometrycznych, a następnie dodano 5µl badanej próby. Analizy wykonywano za pomocą spektrofotometru (Beckman DU-68).

Przygotowanie żelu poliakrylamidowego:

Do przeprowadzenia elektroforezy białek wykorzystano metodę rozdziału w żelu poliakrylamidowym. Skład żelu poliakrylamidowego podano w tabeli 15 (Tab. 15).

SKŁAD	ŻEL ZAGĘSZCZAJĄCY 5%	
Woda	2,33 ml	
Akrylamid 30%, 29:1	0,67 ml	
Bufor B	1 ml	
APS 10%	40 µl	
TEMED	8 µl	
SKŁAD	ŻEL ROZDZIELAJĄCY	
	14%	12%
Woda	2,27 ml	2,8 ml
Akrylamid 30%, 29:1	3,73 ml	3,2 ml
Bufor C	2 ml	2 ml
APS 10%	80 µl	80 µl
TEMED	8 µl	8 µl

Bufor B (0.6M TRIS-HCl, pH 6.8, 0.6% SDS)

Bufor C (1.5M TRIS-HCl, pH 8.8, 0.4% SDS)

Tab. 15. Skład żelu poliakrylamidowego zagęszczającego oraz rozdzielającego.

Żel zagęszczający i rozdzielający umieszczono w specjalnej kasce do elektroforezy. Na 14% żel rozdzielający naniesiono 1 ml 2-butanolu, w celu usunięcia pęcherzów powietrza i wyrównania powierzchni żelu. 2-butanol usunięto, a powierzchnię żelu rozdzielającego osuszono. Następnie do kasety wiano 5% żel zagęszczający, a całość zamknięto grzebieniem.

Elektroforeza:

Elektroforezę białek prowadzono w buforze Tris-glicyna, 0,1% SDS przy stałym napięciu 160V przez 90 min w aparacie XCell SureLock Mini-Cell.

Transfer białek na membranę PVDF oraz detekcja badanych białek:

Po elektroforezie dokonano transferu białek z żelu poliakrylamidowego na membranę PVDF z wykorzystaniem standardowego zestawu składającego się kolejno z gąbki do transferu, bibuły Whatmana, żelu poliakrylamidowego, membrany PVDF aktywowanej wcześniej w metanolu, bibuły Whatmana oraz gąbki do transferu. Transfer przeprowadzono

w buforze (Tris-glicyna, metanol w stosunku 9:1) przy stałym natężeniu 100mA przez 90 min.

Po transferze, membranę PVDF inkubowano w 5% roztworze odtłuszczonego mleka w proszku, w buforze TTBS (20mM Tris, 150mM NaCl, 0,1% Tween 20) przez 1h, w temperaturze pokojowej. Kolejno membranę inkubowano z odpowiednim przeciwciałem I-rzędowym (CTR1, CCS lub SOD1) w buforze TTBS przez 16h w temperaturze +4° C (Tab. 13). Membranę płukano 3-krotnie po 15 min w buforze TTBS, a następnie inkubowano z odpowiednim przeciwciałem II-rzędowym znakowanym HRP (peroksydaza chrzanowa) w buforze TTBS, przez 1h w temperaturze pokojowej (Tab. 16). Membranę ponownie płukano 3-krotnie po 15 min w buforze TTBS. Detekcję białek wykonano w oparciu o metodę chemiluminescencji z wykorzystaniem zestawu substratów dla HRP. Wynik utrwalono na kliszy fotograficznej X-ray film.

Typ II-rzędowego przeciwciała	Rozcieńczenie w 3%TTBS w PBS	Typ	Immunizacja	Producent
Koza anty-królik	1:20 000	poliklonalne	koza	Sigma-Aldrich
Osiół anty-koza	1:20 000	poliklonalne	osioł	Sigma-Aldrich

Tab. 16. Zestawienie przeciwciał II-rzędowych wykorzystanych do reakcji Western blot.

Analiza densytometryczna:

Analizę densytometryczną pozwalającą na ilościową ocenę otrzymanych wyników reakcji Western blot badanych białek wykonano za pomocą oprogramowania Quantity One (Bio-Rad).

6. 3. 6. Analiza aktywności białka SOD1

Analizę aktywności białka SOD1 przeprowadzono dla osobników wszystkich badanych grup wiekowych. W tym celu wykorzystano cytoplazmatyczne ekstrakty białkowe nerek przygotowane w sposób identyczny jak opisany w sekcji 7.3.5. Bufor obciążający nie zawierał SDS oraz β -merkaptioetanol celem zachowania natywnej formy białka.

Przygotowanie żelu:

Białko SOD1 zostało rozdzielone za pomocą metody elektroforezy w 12% żelu poliakrylamidowym. W tym celu przygotowano odpowiednie żełe poliakrylamidowe – 5% żel zagęszczający oraz 12% żel rozdzielający (Tab. 15.).

Żel został umieszczony w specjalnej kasecie do elektroforezy wraz z umieszczonym grzebieniem do momentu polimeryzacji żelu. Następnie, po polimeryzacji żelu i usunięciu grzebieni do dołków naniesiono po 15µl każdej z badanych prób.

Elektroforeza:

Elektroforezę prowadzono w warunkach niedenaturujących i nieredukujących w buforze Tris-glicyna, przy stałym napięciu 160V przez 2h w aparacie XCell SureLock Mini-Cell.

Po wykonaniu elektroforezy żel zanurzono w buforze (50mM fosforan potasu o pH 7,8, 1µl/ml TEMED, 0.1mg/ml ryboflawina, 10mg NBT) w ciemności przez 30 min w temperaturze pokojowej. Następnie żel poddano ekspozycji świetlnej do momentu ukazania się jasnych prążków na ciemnoniebieskim tle. Reakcję zatrzymano poprzez wypłukanie żelu wodą.

Analiza densytometryczna:

Wyniki analizy aktywności białka SOD1 zostały znormalizowane względem wyników ekspresji białka SOD1 otrzymanych przy użyciu metody Western blot. Analizę densytometryczną pozwalającą na ilościową ocenę otrzymanych wyników reakcji aktywności badanego białka SOD1 wykonano za pomocą oprogramowania Quantity One (Bio-Rad).

7. Wyniki

Mutacja *mosaic* jest letalna dla hemizygotycznych samców (*ms/-*), które umierają około 15-17 dnia życia rozwijając cały zespół objawów patologicznych charakterystycznych dla niedoboru miedzi (Fot. 1). Mutanty *mosaic* charakteryzują się znacznie obniżoną masą ciała oraz rozjaśnieniem barwy sierści w porównaniu z osobnikami o genotypie dzikim. U myszy mutantów występują również charakterystycznie skrócone wibrysy. Cecha ta pozwala na odróżnienie samców mutantów od osobników o genotypie dzikim już kilka godzin po urodzeniu. Samce mutanty w drugim tygodniu życia rozwijają cały szereg objawów neurologicznych takich jak drżenie, niezdolność ruchowa i charakterystyczne „ciągnięcie” tylnych kończyn kończące się całkowitym paraliżem. Podanie mutantom *mosaic* miedzi z ominięciem bariery jelitowej znosi letalne skutki mutacji (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2017, Styrna 1977).

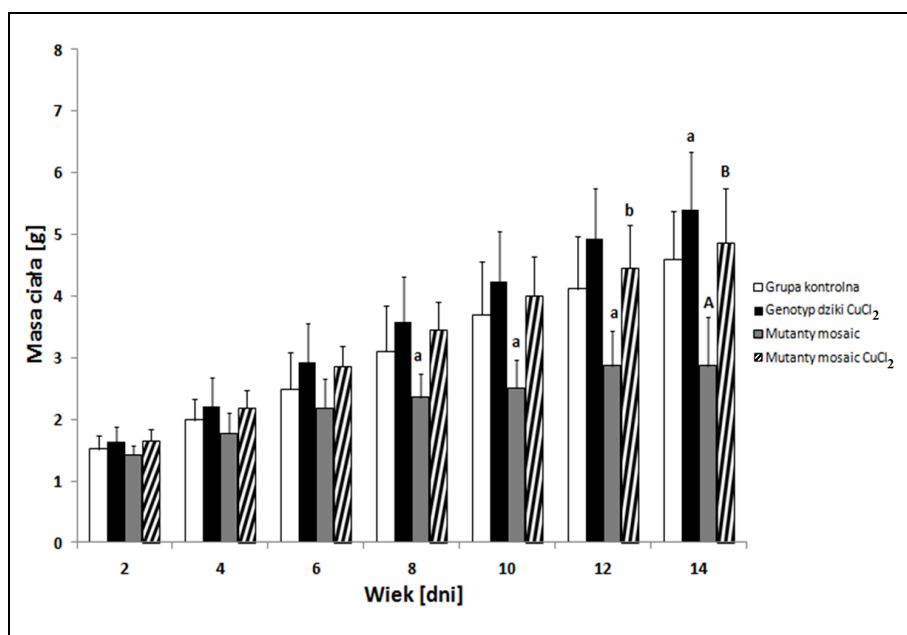
7. 1. Analiza wpływu iniekcji chlorkiem miedzi (II) na zmiany masy ciała

7. 1. 1. Analiza wpływu iniekcji chlorkiem miedzi (II) na zmiany masy ciała – okres od 2 do 46 dnia życia

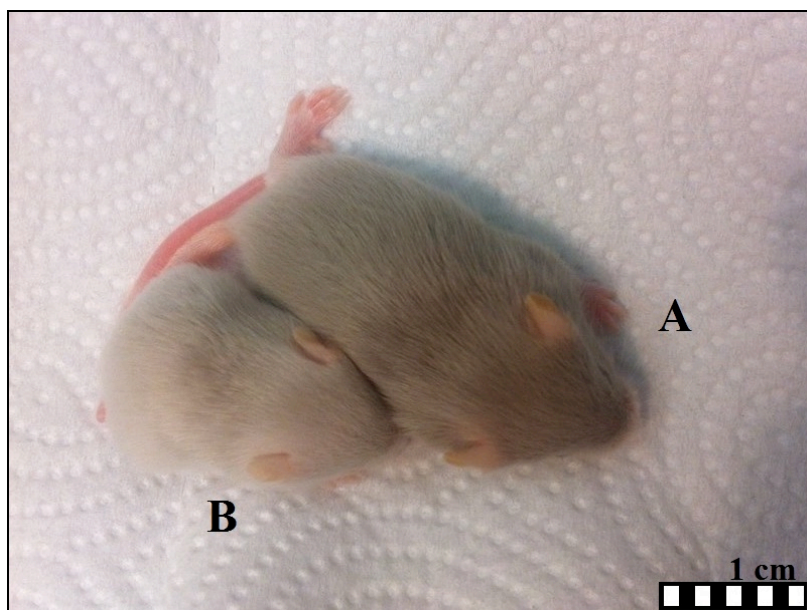
Począwszy od 2 aż do 44 dnia życia samce mutanty *mosaic* oraz osobniki o genotypie dzikim pochodzące z tego samego miotu otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II) w odstępach 48-godzinnych, w dawkach opisanych w rozdziale „Materiały i metody”. Wszystkie zwierzęta ważono, każdorazowo przed wykonaniem iniekcji. Oprócz wymienionych wyżej grup traktowanych CuCl_2 , ważono również samce mutanty *mosaic* nie otrzymujące iniekcji, co pozwoliło na wykazanie pozytywnego efektu podjętej terapii. Powyżej 14 dnia życia większość mutantów niepoddanych terapii CuCl_2 umierało, wykazując zaawansowane objawy neurologiczne związane z niedoborem miedzi, dlatego też analizę masy ciała tych zwierząt zakończono w 14 dniu życia. Grupę kontrolną dla wszystkich badanych zwierząt stanowiły samce o genotypie dzikim, którym nie podawano iniekcji CuCl_2 . W okresie od 2 do 14 dnia było możliwe przeprowadzenie analizy masy ciała na 4 grupach zwierząt.

Jak pokazano na wykresie 1, masa ciała noworodków w drugim dniu życia była podobna we wszystkich badanych grupach (Wyk. 1). Następnie obserwowano, że wraz z wiekiem zwiększa się masa ciała u obu grup samców o genotypie dzikim (+/- oraz +/-Cu), a szczególnie było to zaznaczone u samców poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu). Jednak różnice statystycznie istotne pomiędzy tymi grupami zaobserwowano dopiero w 14 dniu życia

myszy. Wzrost masy ciała następował również u samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , a w 14 dniu życia ich masa nie różniła się od tej jaką osiągnęły samce kontrolne (Wyk. 1). Potwierdza to pozytywny efekt terapii, gdyż samce mutanty *mosaic* nietraktowane roztworem CuCl_2 rosły o wiele wolniej. Już w 8 dniu życia tych zwierząt ich masa ciała była statystycznie istotnie niższa niż u samców kontrolnych i różnice takie utrzymywały się aż do 14 dnia życia. Różnica w wielkości ciała 14-dniowych myszy o genotypie dzikim oraz mutantu *mosaic* jest również bardzo wyraźnie widoczna na fotografii 1 (Fot. 1). Porównując masę ciała obu grup samców mutantów *mosaic* ($\text{ms}/-$ i $\text{ms}/-\text{Cu}$) można zauważyć, że samce $\text{ms}/-\text{Cu}$ przyrastały znacznie szybciej w ciągu pierwszego tygodnia życia niż mutanty $\text{ms}/-$, jednak różnice statystycznie istotne pomiędzy tymi grupami stwierdzono w 12 dniu życia (Wyk. 1). Mutanty *mosaic* poddane terapii CuCl_2 rozwijały się na tyle dobrze, że nie stwierdzono różnic w masie ciała 14-dniowych samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 w porównaniu do 14-dniowych samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (Wyk. 1). Na Fotografii 2 przedstawiono 14-dniowe osobniki $+/-\text{Cu}(14)$ i $\text{ms}/-\text{Cu}(14)$, samce te są bardzo podobnej wielkości (Fot. 2).



Wyk. 1. Zmiany masy ciała w okresie od 2 do 14 dnia życia u: osobników z grupy kontrolnej (osobniki o genotypie dzikim), $n=9$; osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , $n=14$; mutantów *mosaic* niepoddanych terapii CuCl_2 , $n=6$; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , $n=16$. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice: a – różny od osobników o genotypie dzikim $P<0,05$; A- różny od osobników o genotypie dzikim $P<0,001$; b – różny od osobników *mosaic* niepoddanych terapii CuCl_2 $P<0,05$; B – różny od osobników *mosaic* niepoddanych terapii CuCl_2 $P<0,001$ (Lenartowicz i wsp. 2017 – zmodyfikowane).

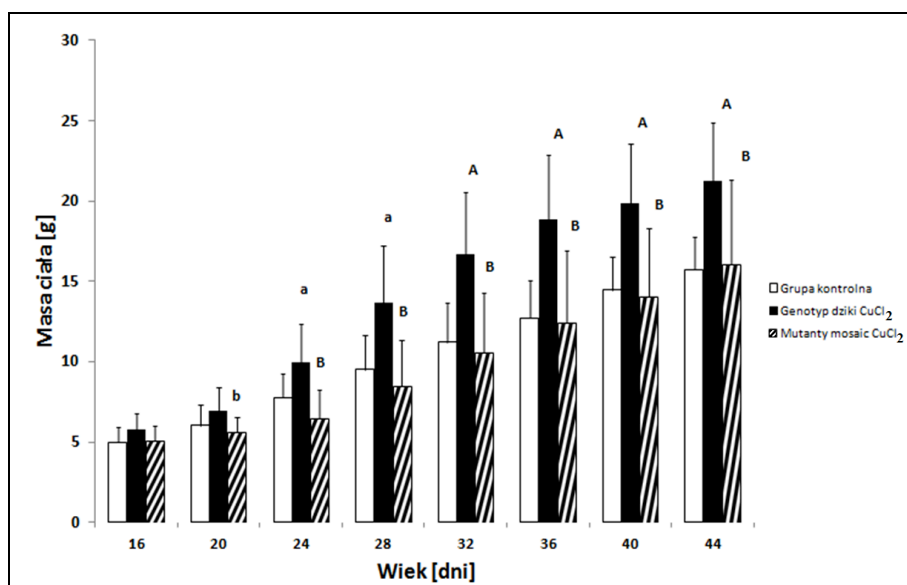


Fot. 1. Samce 14-dniowe nietraktowane terapii chlorkiem miedzi (II). Osobnik A - samiec o genotypie dzikim; osobnik B - mutant *mosaic*. Widoczna wyraźna różnica w wielkości obu samców, a także rozjaśnienie sierści (depigmentacja) u samca mutantu *mosaic*.



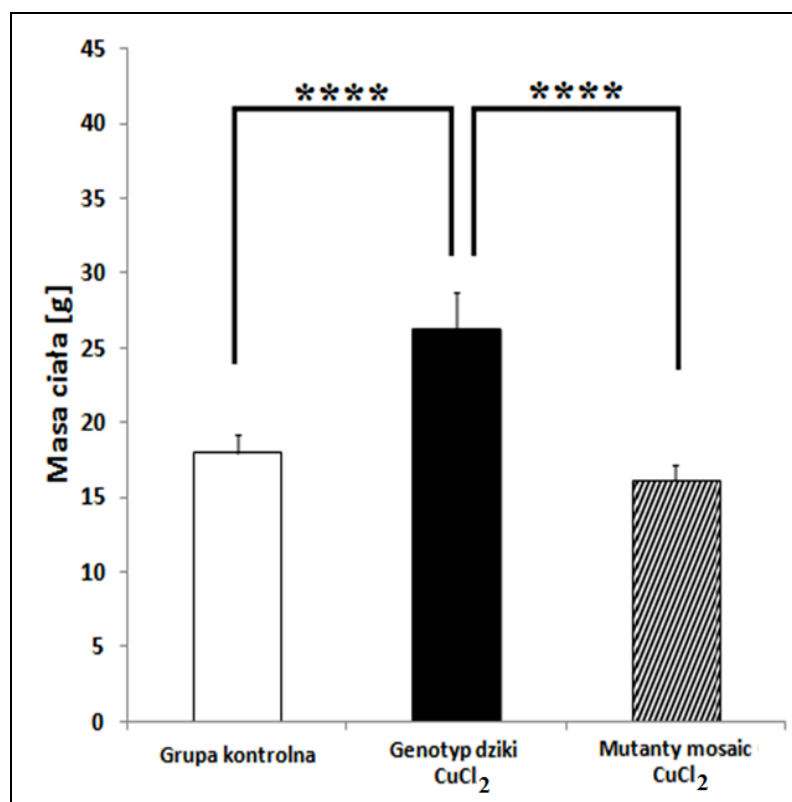
Fot. 2. Samce 14-dniowe traktowane chlorkiem miedzi (II). Osobnik A - samiec o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 ; osobnik B - mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 . Brak różnic w wielkości obu samców. Widoczna rozjaśniona barwa sierści (depigmentacja) oraz szara plamka na sierści w miejscu podania roztworu chlorku miedzi (II) u samca mutantu *mosaic*.

Począwszy od 16 do 44 dnia analizę masy ciała kontynuowano dla trzech grup myszy: +/-, +/--(Cu) oraz ms/-(Cu). Otrzymane wyniki wskazują, że wraz z wiekiem następował wzrost masy ciała we wszystkich grupach badanych samców. Ciekawą obserwacją może być to, że w grupie osobników 16-dniowych oraz 20-dniowych nie odnotowano zmian masy ciała samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ w porównaniu do samców kontrolnych, pomimo że różnice takie odnotowano w 14 dniu życia (Wyk. 2). Otrzymane wyniki można tłumaczyć tym, że około 16 dnia życia myszy przestają być karmione przez matki i zaczynają jeść samodzielnie, co może zacierać różnice pomiędzy grupami. Począwszy od 24 dnia życia aż do zakończenia suplementacji (44 dzień życia) ponownie stwierdzono istotny statystycznie wzrost masy ciała u samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ w porównaniu do masy ciała osobników o genotypie dzikim (Wyk. 2). Masa ciała samców o genotypie dzikim otrzymujących suplementację CuCl₂ była również statystycznie istotnie wyższa w porównaniu do masy ciała samców mutantów *mosaic* otrzymujących taką samą dawkę roztworu chlorku miedzi (II). Różnice statystycznie istotne pomiędzy tymi grupami zaobserwowano w 20 dniu życia i utrzymywały się one aż do momentu zakończenia suplementacji, czyli do 44 dnia życia (Wyk. 2.). Masa ciała mutantów *mosaic* poddanych terapii była podobna jak u samców grupy kontrolnej. Brak różnic utrzymywał się od 16 dnia życia aż do momentu zakończenia terapii, czyli do 44 dnia życia (Wyk.2).

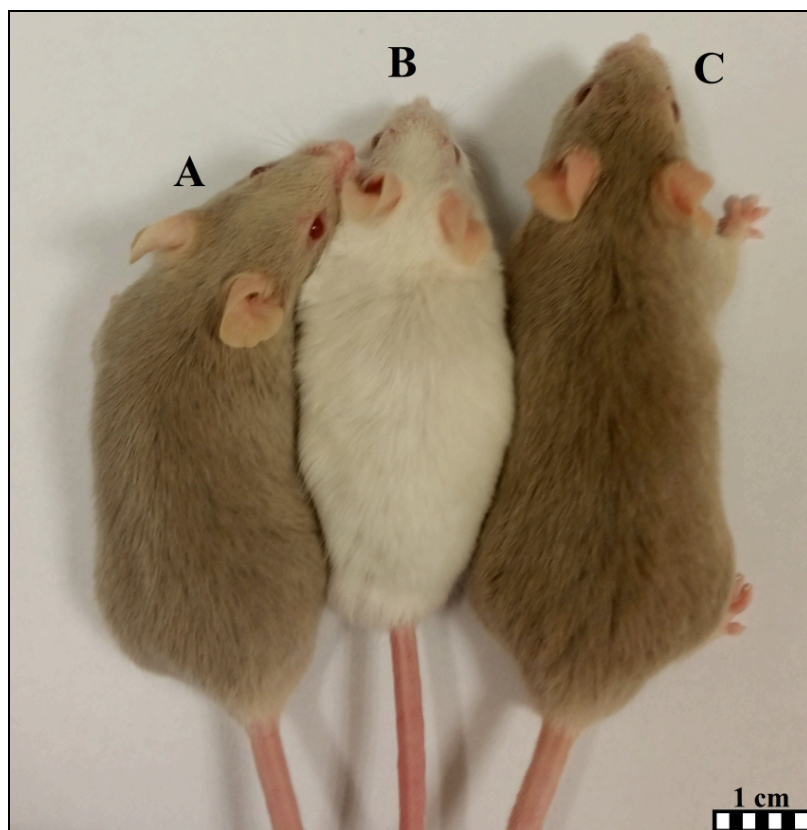


Wyk. 2. Zmiana masy ciała w okresie od 16 do 44 dnia życia u: osobników z grupy kontrolnej (osobniki o genotypie dzikim), n=9; osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, n=14; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂, n=16. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice: a – różny od osobników o genotypie dzikim P<0,05; A- różny od osobników o genotypie dzikim P<0,001; b – różny od osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ P<0,05; B – różny od osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ P<0,001 (Lenartowicz i wsp. 2017 – zmodyfikowane).

Podawanie roztworu CuCl₂ zakończono w 44 dniu życia zwierząt, a część myszy doświadczalnych została uśmiercona w 46 dniu życia. W grupie 46-dniowych myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) masa ciała samców była istotnie statystycznie wyższa w porównaniu do osobników z grupy kontrolnej, a także w porównaniu do mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ (Wyk. 3). Natomiast nie stwierdzono różnic w masie ciała 46-dniowych samców mutantów *mosaic* poddanych terapii w porównaniu do osobników grupy kontrolnej (Wyk.3). Samce mutanty nie wykazywały również objawów neurologicznych spowodowanych niedoborem miedzi (drżenie, niedowłady), a także poruszały się podobnie jak osobniki zdrowe. Barwa sierści tych osobników była jednak nadal jaśniejsza niż u samców o genotypie dzikim (Fot. 3).



Wyk. 3. Zmiany masy ciała w grupie osobników 46-dniowych. Masa ciała 46-dniowych osobników o genotypie dzikim (kontrola), n=6; osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂; n=8 oraz mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂; n=6. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD. Oznaczono statystycznie różnice (ANOVA dwuczynnikowa): ****P<0,0001.



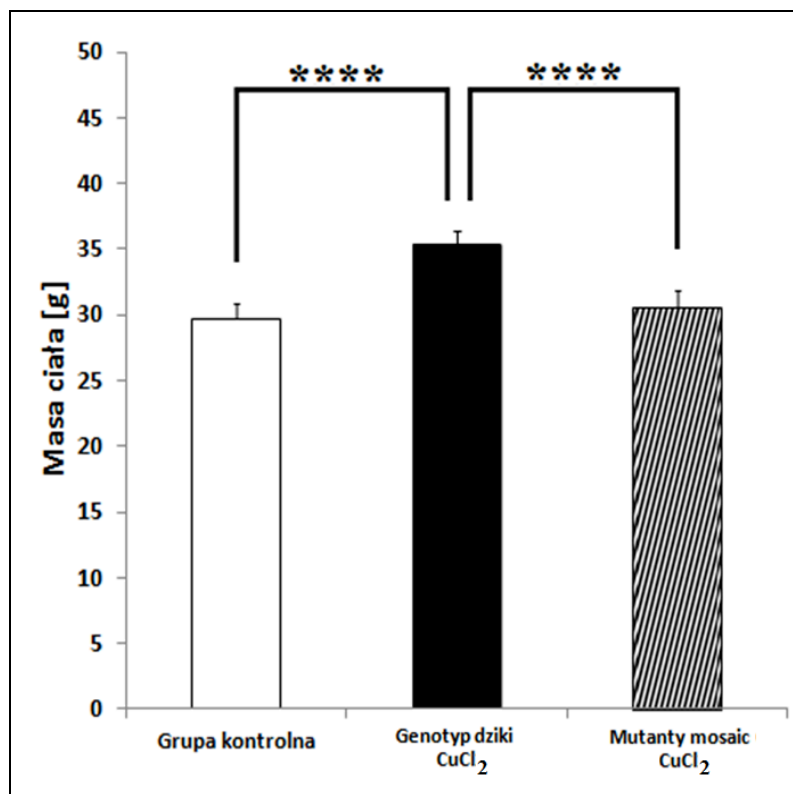
Fot. 3. Samce 46-dniowe. Osobnik A - samiec o genotypie dzikim; osobnik B - mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 ; osobnik C - samiec o genotypie dzikim poddany suplementacji chlorkiem miedzi (II). Widoczne rozjaśnienie sierści u osobnika mutantu *mosaic*. Zwraca uwagę brak różnic w wielkości myszy o genotypie dzikim (osobnik z grupy kontrolnej), a mutantem *mosaic* poddanym terapii CuCl_2 . Osobnik o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 jest wyraźnie większy w porównaniu do samca z grupy kontrolnej oraz mutantu *mosaic* poddanego terapii CuCl_2 .

7. 1. 2. Analiza wpływu terapii iniekcji chlorkiem miedzi (II) na zmiany masy ciała – osobniki 6 miesięczne

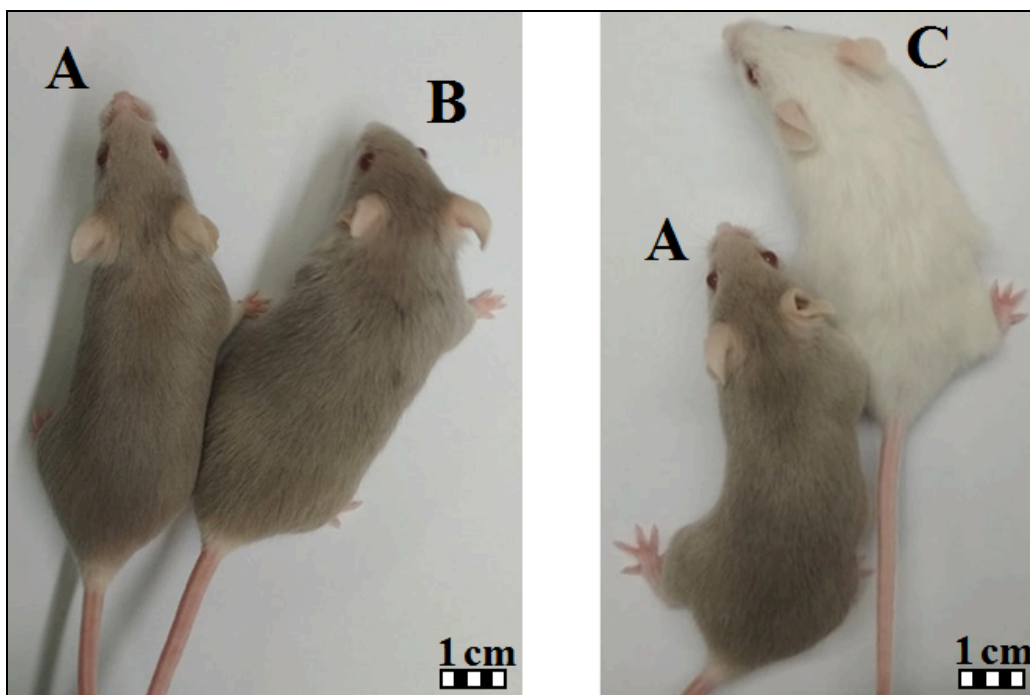
W celu analizy długotrwałego efektu terapii część osobników, u których podawanie chlorku miedzi (II) zakończono w 44 dniu życia, hodowano aż do osiągnięcia przez te zwierzęta wieku 6 miesięcy.

Wyniki analizy masy ciała przeprowadzone w obrębie trzech grup badanych zwierząt 6 miesięcznych wykazały statystycznie istotny wzrost masy ciała samców z grupy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(6)) w porównaniu zarówno do osobników grupy kontrolnej (+/- (6)), jak i do mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (ms/-Cu(6)). Nie stwierdzono natomiast różnic statystycznie istotnych dotyczących masy

ciała pomiędzy osobnikami grupy kontrolnej, a mutantami *mosaic*, które otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II) (Wyk. 4). Samce mutanty *mosaic* należące do tej grupy wiekowej nie wykazywały objawów choroby na tle neurologicznym (brak drżenia, niedowładu oraz niezdolności ruchowej) były aktywne i poruszały się w sposób prawidłowy. Sierść tych osobników była nadal rozjaśniona w porównaniu do zwierząt grupy kontrolnej (Fot. 4).



Wyk. 4. Zmiany masy ciała osobników 6 miesięcznych. Masa ciała osobników 6 miesięcznych o genotypie dzikim (kontrola), n=7; osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, n=7; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂, n=7. Wyniki przedstawiono jako średnia ± SD. Oznaczono statystycznie różnice (ANOVA dwuczynnikowa): ****P<0,0001.



Fot. 4. Samce 6 miesięczne. Osobnik A - samiec o genotypie dzikim; B - samiec o genotypie dzikim poddany suplementacji chlorkiem miedzi (II); C - mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 . Widoczne rozjaśnienie sierści u osobnika mutantu *mosaic*.

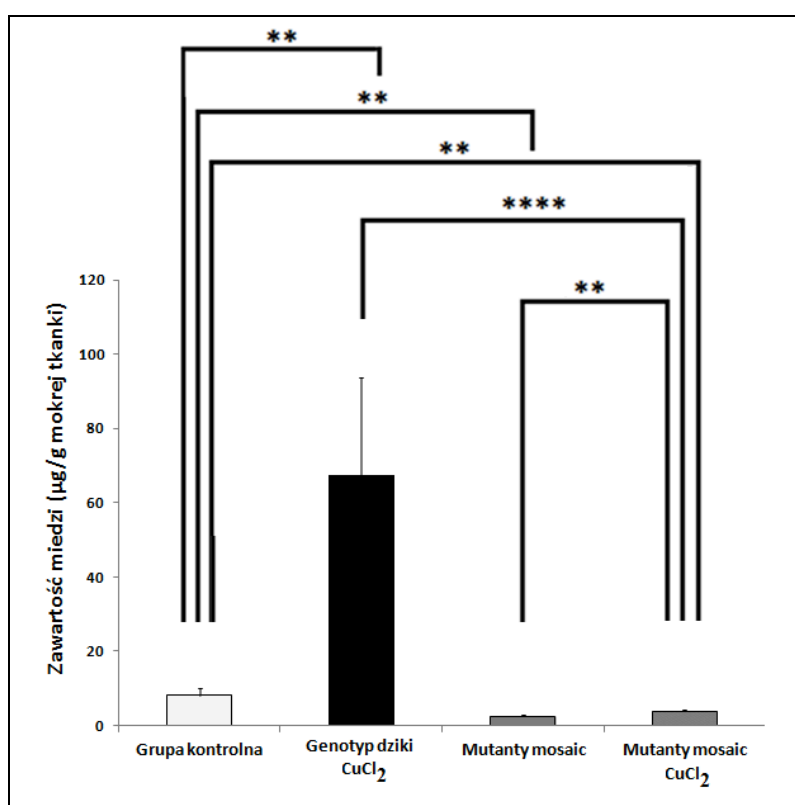
7. 2. Analiza zawartości miedzi w wątrobie

U ssaków głównym organem magazynującym nadmiar miedzi jest wątroba. Szczególnie wysoką zawartość tego pierwiastka w wątrobie opisano u osobników młodych (Chun i wsp. 2017, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2014, Lenartowicz i wsp. 2017). W wątrobie nadmiar miedzi wiązany jest przez białko metalotioneinę (Di Donato i Sarkar 1997, Hellman i wsp. 2002, Wijmenga i Klomp 2004). Dlatego w obecnej pracy sprawdzono jak podawanie chlorku miedzi (II) wpływa na zawartość tego pierwiastka w wątrobie myszy o genotypie dzikim oraz samców mutantów *mosaic*. W tym celu przeprowadzono analizę zawartości miedzi w wątrobie metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA) w organach pochodzących od zwierząt należących do trzech grup wiekowych (Tab. 4-6).

7. 2. 1. Analiza zawartości miedzi w wątrobie – osobniki 14-dniowe

U myszy młodych 14-dniowych o genotypie dzikim suplementacja chlorkiem miedzi (II) spowodowała znaczący wzrost zawartości miedzi w wątrobie. Przeprowadzona analiza wykazała wysoce statystycznie istotne różnice w zawartości miedzi w wątrobie pomiędzy grupami osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ($+/-\text{Cu}(14)$) ($67,40 \pm$

26,44 $\mu\text{g/g}$ mokrej masy) w porównaniu do osobników kontrolnych ($+/- (14)$) ($8,01 \pm 2,11$ $\mu\text{g/g}$ mokrej masy). Zawartość miedzi w wątrobie samców ($+/-\text{Cu}(14)$) była również istotnie statystycznie wyższa niż u obu grup badanych mutantów ($\text{ms}/-(14)$) ($2,49 \pm 0,26$ $\mu\text{g/g}$ mokrej masy) i ($\text{ms}/-\text{Cu}(14)$) ($3,80 \pm 0,58$ $\mu\text{g/g}$ mokrej masy). Przeprowadzone analizy wykazały również statystycznie istotny wzrost zawartości miedzi w wątrobie mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 w porównaniu do mutantów niepoddanych terapii. Jednak u mutantów poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) zawartość miedzi w wątrobie była niższa niż u zwierząt grupy kontrolnej (Wyk. 5).

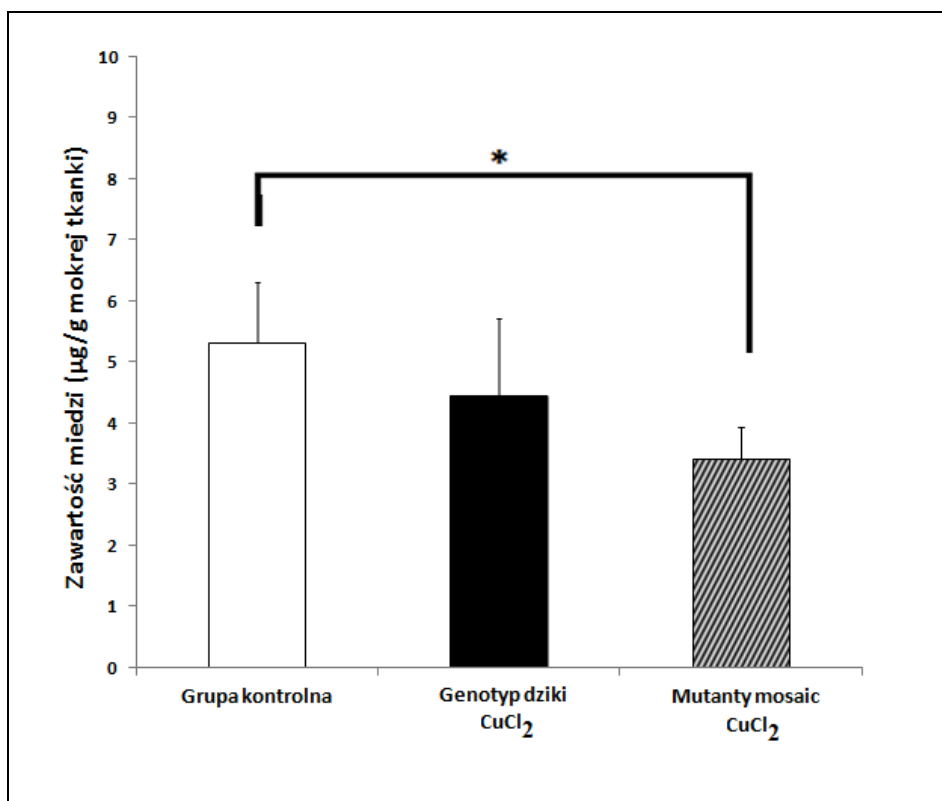


Wyk. 5. Zawartość miedzi w wątrobie u osobników 14-dniowych: samców o genotypie dzikim, $n=5$; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , $n=5$; samców mutantów *mosaic*, $n=4$; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , $n=5$. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono różnice statystyczne istotne (ANOVA dwuczynnikowa): ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$ (Lenartowicz i wsp. 2017 - zmodyfikowane).

7. 2. 2. Analiza zawartości miedzi w wątrobie – osobniki 46-dniowe

Przeprowadzone analizy wykazały, że u myszy 46-dniowych pomimo długotrwałej suplementacji CuCl_2 , zawartość miedzi w wątrobie samców $+/-\text{Cu}(46)$ ($4,45 \pm 1,26$ $\mu\text{g/g}$ mokrej masy) była podobna, jak u samców z grupy kontrolnej ($5,31 \pm 0,98$ $\mu\text{g/g}$ mokrej masy).

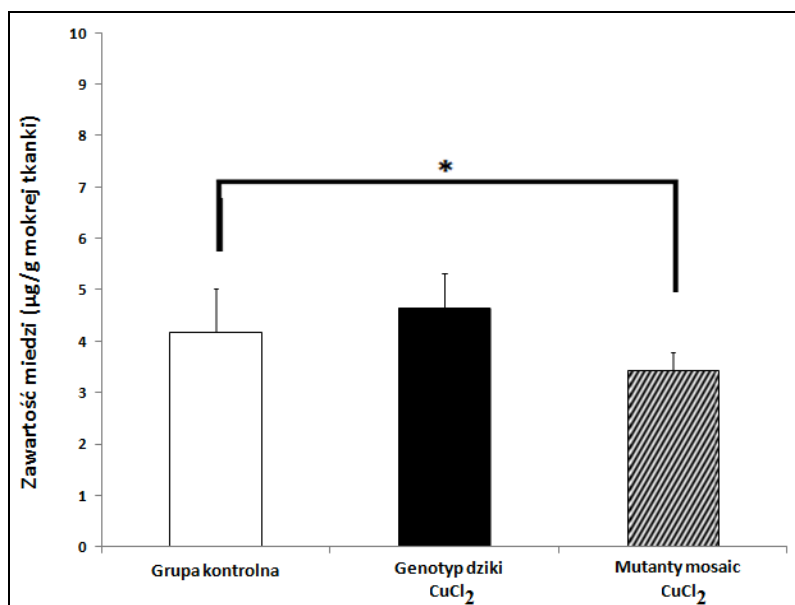
W grupie osobników 46-dniowych różnice statystycznie istotne stwierdzono tylko pomiędzy grupą kontrolną, a grupą mutantów *mosaic* poddanych terapii ($5,31 \pm 0,98 \mu\text{g/g}$ mokrej masy vs $3,41 \pm 0,52 \mu\text{g/g}$ mokrej masy). U mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 zawartość miedzi w wątrobie była niższa niż u samców należących do grupy kontrolnej (Wyk. 6).



Wyk. 6. Zawartość miedzi w wątrobie u osobników 46-dniowych: samców o genotypie dzikim, $n=5$; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , $n=5$; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , $n=4$. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono różnice statystyczne istotne (ANOVA dwuczynnikowa): $*P<0,05$.

7. 2. 3. Analiza zawartości miedzi w wątrobie – osobniki 6 miesięczne

W przeprowadzonych badaniach sprawdzono również, czy w grupach myszy 6 miesięcznych istnieją statystycznie istotne różnice w zawartości miedzi w wątrobie spowodowane suplementacją chlorku miedzi (II). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w zawartości tego pierwiastka pomiędzy osobnikami o genotypie dzikim $+/-$ (6) oraz $+/-\text{Cu}$ (6) ($4,17 \pm 0,84 \mu\text{g/g}$ mokrej masy vs $4,65 \pm 0,69 \mu\text{g/g}$ mokrej masy), jednak u samców mutantów *mosaic* poddanych terapii zawartość miedzi była istotnie statystycznie niższa niż u samców należących do grupy kontrolnej ($3,44 \pm 0,34 \mu\text{g/g}$ mokrej masy vs $4,17 \pm 0,84 \mu\text{g/g}$ mokrej masy) (Wyk. 7.).



Wyk. 7. Zawartość miedzi w wątrobie u osobników 6 miesięcznych: samców o genotypie dzikim, n=4; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, n=5; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂, n=4. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono różnice statystyczne istotne (ANOVA dwuczynnikowa): *P<0,05 (Lenartowicz i wsp. 2017-zmodyfikowane).

7. 3. Analiza zawartości miedzi w nerkach

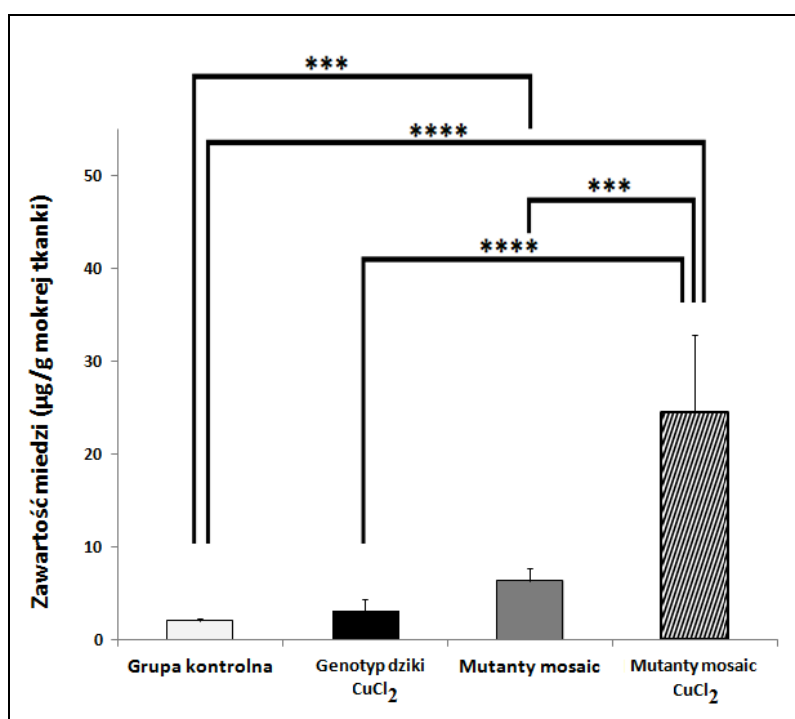
U myszy mutantów *mosaic* w wyniku braku aktywności białka ATP7A dochodzi do akumulacji miedzi w nerkach oraz w jelicie cienkim (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2017). W obecnej pracy stwierdzono, że podawanie związków miedzi z pominięciem bariery jelitowej prowadzi do zwiększenia masy ciała, a także wydłużenia życia mutantów *mosaic*, jednak nadmiar miedzi jest akumulowany w obrębie nerek tych zwierząt.

W celu porównania zawartości miedzi w nerkach u wszystkich badanych grup wykonano oznaczenie poziomu tego pierwiastka z wykorzystaniem metody absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA) w organach pochodzących od zwierząt należących do trzech grup wiekowych (Tab. 4-6).

7. 3. 1. Analiza zawartości miedzi w nerkach – osobniki 14-dniowe

Przeprowadzona analiza nie wykazała statystycznie istotnych różnic w zawartości miedzi w nerce pomiędzy grupą kontrolną (+/- (14)), a grupą osobników o genotypie dzikim,

które zostały poddane suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(14)) ($2,06 \pm 0,22 \mu\text{g/g}$ mokrej masy vs $3,13 \pm 1,21 \mu\text{g/g}$ mokrej masy). U mutantów *mosaic* (ms/-(14)) zawartość miedzi w nerkach była podniesiona w stosunku do grupy kontrolnej ($6,31 \pm 1,36 \mu\text{g/g}$ mokrej masy vs $2,06 \pm 0,22 \mu\text{g/g}$ mokrej masy), a różnice były statystycznie istotne. W grupie myszy mutantów *mosaic*, które zostały poddane terapii CuCl_2 (ms/-Cu(14)) zawartość miedzi w nerce była niezwykle wysoka i wynosiła $24,58 \pm 8,28 \mu\text{g/g}$ mokrej masy. Otrzymane wyniki wskazują na wysoce istotny statystycznie wzrost poziomu miedzi w grupie mutantów poddanych terapii CuCl_2 (ms/-Cu(14)) w porównaniu do wszystkich pozostałych grup (Wyk. 8).



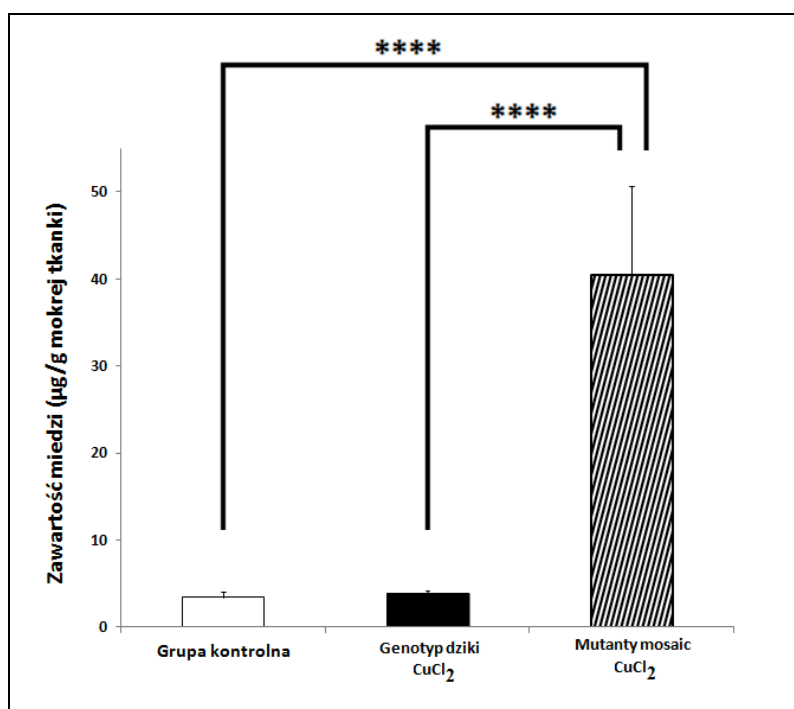
Wyk. 8. Zawartość miedzi w nerkach u osobników 14-dniowych: samców o genotypie dzikim, n=4; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=5; samców mutantów *mosaic*, n=4; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=5. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono różnice statystyczne istotne (ANOVA dwuczynnikowa): *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$.

7. 3. 2. Analiza zawartości miedzi w nerkach – osobniki 46-dniowe

Następną analizowaną grupą wiekową były osobniki 46-dniowe. W grupie tej zwierzęta otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II) do 44 dnia życia. Analizę zawartości miedzi w nerkach przeprowadzono w 46 dniu, aby zbadać jaki wpływ na poziom miedzi w nerkach u myszy ma długotrwałe podawanie związków tego pierwiastka. Analiza zawartości

miedzi metodą ASA nie wykazała statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą osobników kontrolnych (+/-46)) i osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(46)) ($3,42 \pm 0,61 \mu\text{g/g}$ mokrej masy vs $3,81 \pm 0,39 \mu\text{g/g}$ mokrej masy).

Otrzymane wyniki natomiast wykazały znaczący wzrost zawartości miedzi w nerkach mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (ms/-Cu(46)) ($40,51 \pm 10,12 \mu\text{g/g}$ mokrej masy). Wyniki te były statystycznie istotne zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej ($3,42 \pm 0,61 \mu\text{g/g}$ mokrej masy), jak i do myszy o genotypie dzikim suplementowanych chlorkiem miedzi (II) ($3,81 \pm 0,39 \mu\text{g/g}$ mokrej masy) (Wyk. 9).

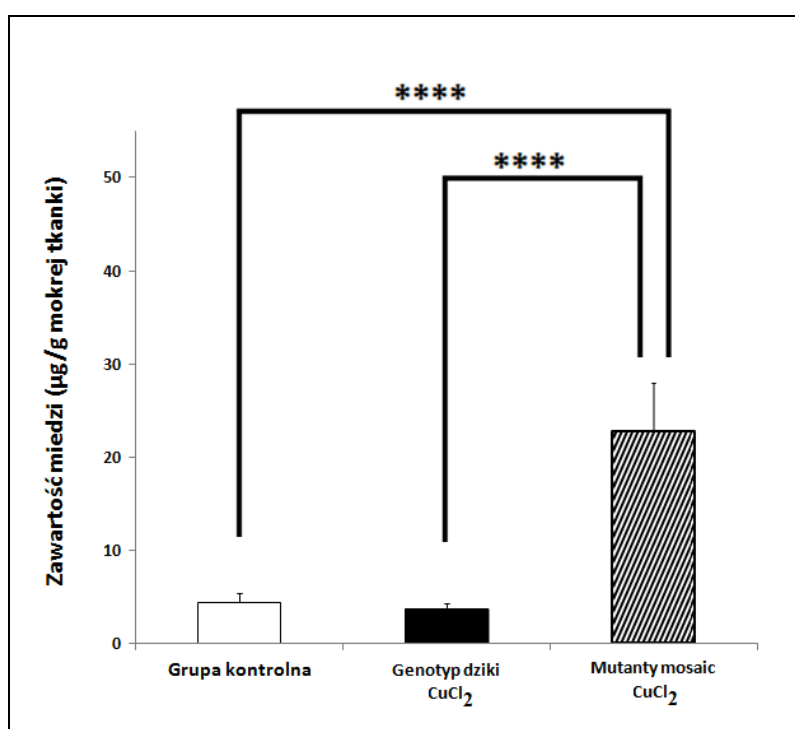


Wyk. 9. Zawartość miedzi w nerkach u osobników 46-dniowych: samców o genotypie dzikim, n=5; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=4; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=4. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono różnice statystyczne istotne (ANOVA dwuczynnikowa): ****P<0,0001.

7. 3. 3. Analiza zawartości miedzi w nerkach – osobniki 6 miesięczne

Podawanie roztworu chlorku miedzi (II) myszom mutantom *mosaic* znosi letalne skutki wywołane mutacją w genie *Atp7a*. Jednak, jak wykazały wcześniejsze badania, terapia taka prowadziła do znacznych uszkodzeń nerek u myszy mutantów (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2017). W obecnej pracy przeprowadzono analizę zawartości miedzi w nerkach osobników 6

miesięcznych i wykazano, że nie ma różnic statystycznie istotnych w poziomie zawartości miedzi w nerkach pomiędzy grupą kontrolną, a grupą osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ($+/- (6)$) ($4,40 \pm 1,00 \mu\text{g/g}$ mokrej masy vs $3,70 \pm 0,60 \mu\text{g/g}$ mokrej masy). Natomiast wyniki badania poziomu miedzi w nerkach myszy mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 wykazały ponad 5-krotny wzrost zawartości tego pierwiastka ($22,70 \pm 5,20 \mu\text{g/g}$ mokrej masy) w stosunku do wyniku uzyskanego w grupie kontrolnej ($4,40 \pm 1,00 \mu\text{g/g}$ mokrej masy), jak również w stosunku do grupy osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) ($3,70 \pm 0,60 \mu\text{g/g}$ mokrej masy) (Wyk. 10).



Wyk. 10. Zawartość miedzi w nerkach u osobników 6 miesięcznych: samców o genotypie dzikim, $n=8$; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , $n=9$; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , $n=8$. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono różnice statystyczne istotne (ANOVA dwuczynnikowa): **** $P < 0,0001$.

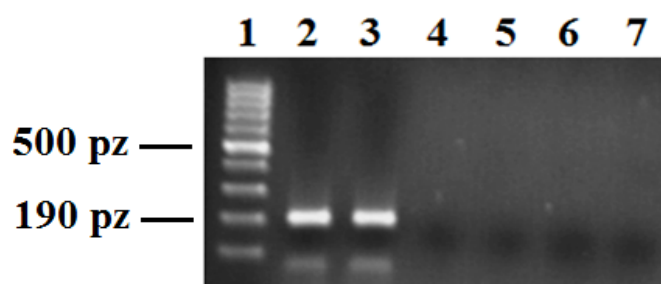
7. 4. Analiza poziomu ekspresji genu i białka *Ctr1/CTR1* oraz badanie komórkowej lokalizacji białka CTR1 w nerkach

Białko CTR1 wykazujące wysokie powinowactwo do jednowartościowych jonów miedzi jest głównym, błonowym transporterem uczestniczącym w pobieraniu kationów miedzi przez komórkę. Białko to w formie aktywnej przyjmuje postać homotrimeru

zlokalizowanego w błonie komórkowej, gdzie tworzy kanał dla transportu jonów miedzi (Larson i wsp. 2010). Ekspresję tego białka stwierdzono we wszystkich rodzajach tkanek i narządów, jednak poziom ekspresji i jego wewnątrzkomórkowa lokalizacja zależą od stężenia jonów miedzi (Bauerly i wsp. 2004, Clifford i wsp. 2016, Guo i wsp. 2004, Kuo i wsp. 2006, Nose i wsp. 2006, Nose i wsp. 2010, Petris i wsp. 2003, Zimnicka i wsp. 2007). Analizę zarówno ekspresji genu *Ctrl*, jak i białka CTR1, a także komórkową lokalizację białka CTR1 w nerkach przeprowadzono w obrębie trzech badanych grup wiekowych obejmujących osobniki: 14-dniowe, 46-dniowe oraz 6 miesięczne (Tab. 4-6).

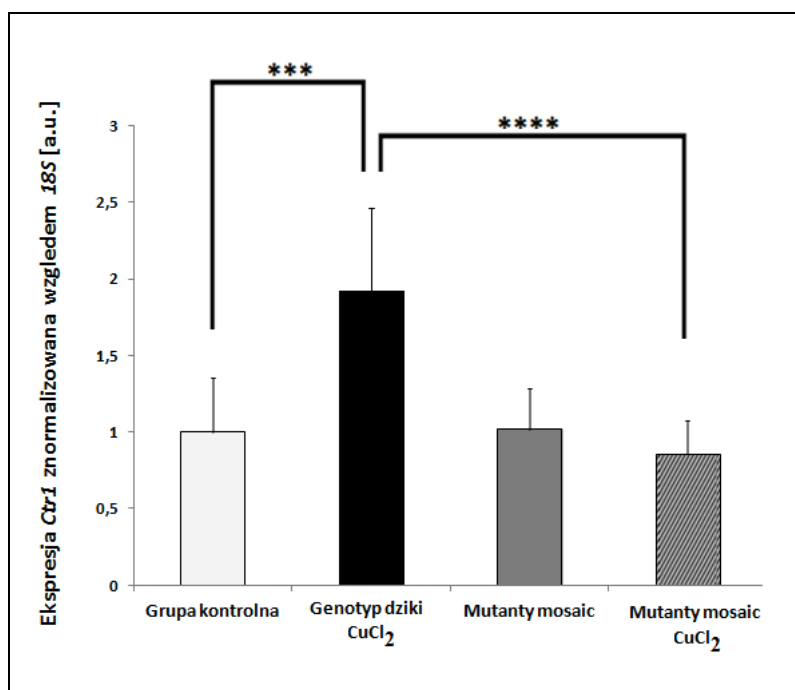
7. 4. 1. Analiza poziomu ekspresji genu *Ctrl* w nerkach – osobniki 14-dniowe

W celu sprawdzenia specyficzności zaprojektowanych starterów dla genu *Ctrl* (Tab. 8.) przeprowadzono reakcję PCR, dzięki której amplifikowano i uwidoczniono na żelu swoisty produkt o wielkości 190 bp (Fot. 5). Produkt ten był widoczny we wszystkich badanych próbkach RT+ zawierających cDNA z nerek osobników o genotypie dzikim – 14-dniowych oraz 6 miesięcznych, co zostało uwidocznione, odpowiednio na ścieżkach 2 i 3. Brak produktu reakcji na ścieżkach 4 i 5 (próby RT-, bez odwrotnej transkryptazy) wskazuje na brak zanieczyszczenia badanych prób genomowym DNA. Brak produktu reakcji na ścieżce 6 (próba zawierająca jako matrycę genomowy DNA) potwierdza, że użyte do reakcji startery były zaprojektowane w odpowiedni sposób. Natomiast brak produktu na ścieżce 7 (próba negatywna), potwierdza brak zanieczyszczenia odczynników i wody używanych do reakcji.



Fot. 5. Wynik reakcji PCR przeprowadzonej dla potwierdzenia specyficzności starterów dla genu *Ctrl*. Na kolejnych ścieżkach: 1 – marker wielkościowy (100 bp), 2 – nerka samca 14-dniowego o genotypie dzikim (RT+); 3 - nerka samca 6 miesięcznego o genotypie dzikim (RT+); 4 – nerka samca 14-dniowego o genotypie dzikim (RT-); 5 - nerka samca 6 miesięcznego o genotypie dzikim (RT-); 6 – próba zawierająca jako matrycę genomowy DNA; 7 – próba negatywna niezawierająca matrycy cDNA.

Porównanie względnego poziomu ekspresji genu *Ctrl* z wykorzystaniem metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$ przeprowadzono dla czterech grup badanych osobników 14-dniowych. Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała wzrost ekspresji genu *Ctrl* u osobników o genotypie dzikim poddanych iniekcji CuCl_2 (+/-Cu(14)), w porównaniu do osobników grupy kontrolnej (+/-(14)). Nie znaleziono natomiast różnic statystycznie istotnych w poziomie mRNA dla genu *Ctrl* pomiędzy grupą zwierząt kontrolnych (+/-(14)), a grupą mutantów *mosaic* (ms/-(14)). Podobnie nie stwierdzono zmian w ekspresji genu *Ctrl* pomiędzy grupą kontrolną (+/-(14)) a grupą mutantów *mosaic* poddanych terapii (ms/-Cu(14)), co wskazuje, że podawanie iniekcji CuCl_2 nie prowadzi do zmian w poziomie ekspresji genu *Ctrl* w nerkach mutantów (ms/-Cu(14)). Przeprowadzone analizy wykazały natomiast statystycznie istotny wzrost ekspresji genu *Ctrl* u zwierząt o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(14)) w porównaniu do grupy mutantów *mosaic* poddanych terapii (ms/-Cu(14)) (Wyk. 11.). Wyniki opisanych powyżej analiz wskazują, że wzrost ekspresji genu *Ctrl* w nerkach następuje tylko u samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 .



Wyk. 11. Zmiany poziomu ekspresji genu *Ctrl* w nerkach 14-dniowych: samców o genotypie dzikim, n=7; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=7; mutantów *mosaic*, n=8; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=8. Poziom ekspresji znormalizowano względem ekspresji genu *18S*. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice (ANOVA dwuczynnikowa): *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$.

7. 4. 2. Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w obrębie kory i rdzenia nerki – osobniki 14-dniowe

W celu określenia komórkowej lokalizacji białka CTR1 wykonano serie reakcji immunofluorescencyjnych na skrawkach mrożeniowych nerek pochodzących od wszystkich analizowanych grup. Do reakcji wykorzystano odpowiednie przeciwciała pierwszorzędowe wyprodukowane w króliku, które wiąże się do białka CTR1 (Tab.13). Następnie użyto drugorzędowego przeciwciała (kozie anty-królicze) sprzężonego z fluorochromem Cy3 (Tab. 14). Jądra komórkowe uwidoczniono wykorzystując do zamknięcia preparatów medium (Vectashield) zawierające DAPI (Tab. 1).

7. 4. 2. 1 Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w części korowej nerki – osobniki 14-dniowe

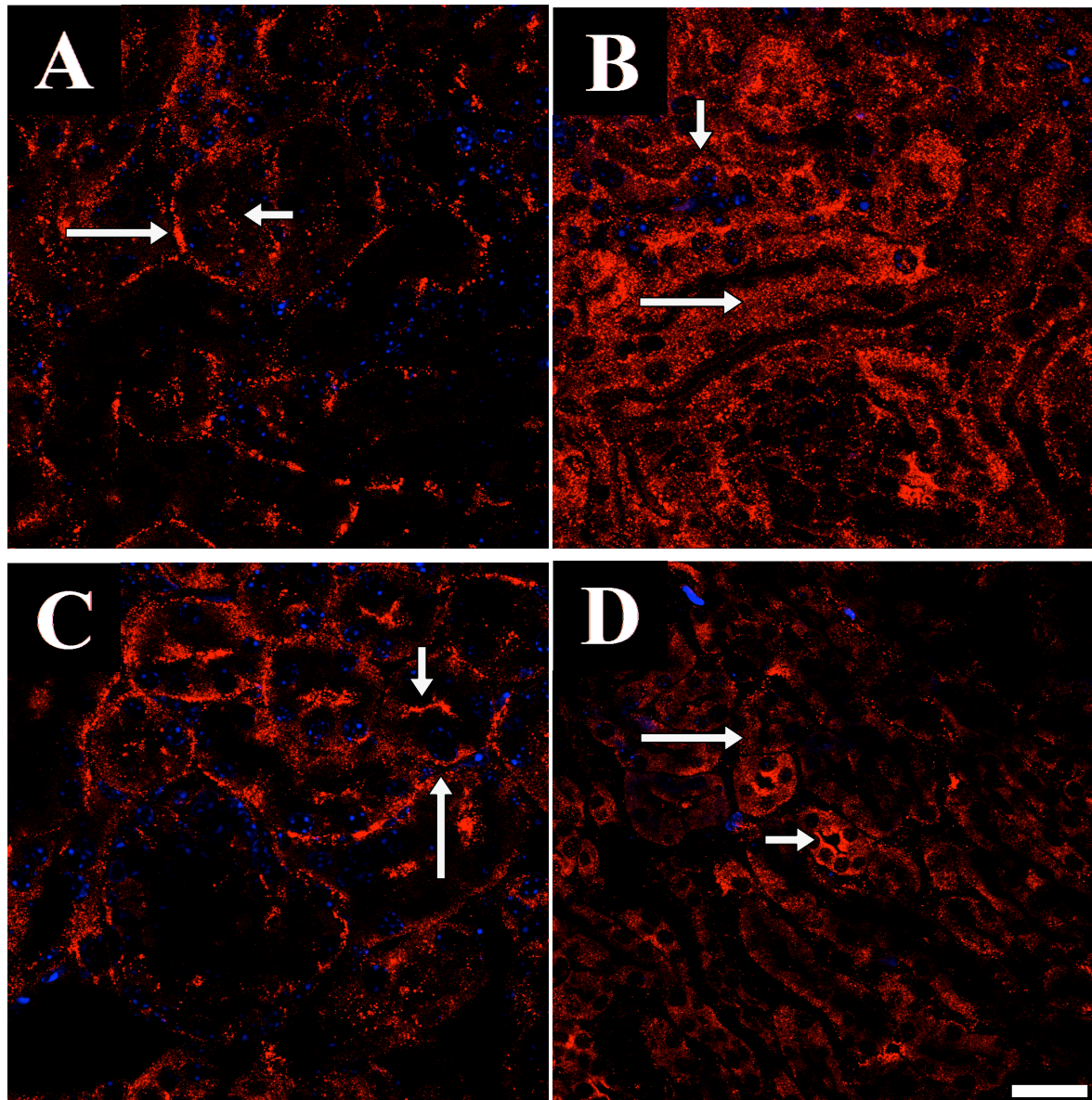
Przeprowadzona reakcja immunofluorescencyjna wykazała, że w obrębie kory nerki u wszystkich badanych grup białko CTR1 wykazuje ekspresję w komórkach kanalików nerkowych, jednak istnieją różnice w wewnątrzkomórkowej lokalizacji tego białka pomiędzy badanymi grupami.

Analiza lokalizacji białka CTR1 w komórkach kanalików nerkowych u 14-dniowych myszy o genotypie dzikim (+/- (14)) wykazała, że białko to zlokalizowane jest głównie w błonie bazalnej (Fot. 6A, długa strzałka), a także w mniejszym stopniu w błonie apikalnej (Fot. 6A, krótka strzałka).

Reakcja wykonana na skrawkach nerek pochodzących od myszy 14-dniowych o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(14)) wykazała, że białko CTR1 zlokalizowane jest w błonie apikalnej komórek nabłonkowych kanalików nerkowych (Fot. 6B, krótka strzałka), a także w cytoplazmie tych komórek (Fot. 6B, długa strzałka). Otrzymany wynik może wskazywać, że podawanie samcom o genotypie dzikim roztworu CuCl_2 prowadzi do internalizacji tego białka do cytoplazmy komórek nabłonkowych kanalików nerkowych (Fot. 6B).

W przypadku nerek 14-dniowych mutantów *mosaic* (ms/- (14)) immunopozytywny sygnał wskazujący na ekspresję białka CTR1 zaobserwowano zarówno w błonie apikalnej (Fot. 6C, krótka strzałka), jak i bazalnej (Fot. 6C, długa strzałka) komórek nabłonkowych kanalików nerkowych.

Analiza lokalizacji białka CTR1 w nerkach 14-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (ms/-Cu(14)) wykazała silny sygnał lokalizacji tego białka w błonie apikalnej komórek nabłonkowych kanalików nerkowych (Fot. 6D, krótka strzałka). Stwierdzono również obecność tego białka w obrębie cytoplazmy tych komórek, co świadczy o jego internalizacji (Fot. 6D, długa strzałka), jednak sygnał ten był znacznie słabszy niż w przypadku osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (Fot. 6B).



Fot. 6. Ekspresja białka CTR1 w korze nerki samców 14-dniowych. A. Osobnik kontrolny, ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w błonie bazalnej (długa strzałka) oraz w błonie apikalnej (krótka strzałka). B. Osobnik o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 , ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w błonie apikalnej (krótka strzałka), a także w cytoplazmie (długa strzałka). C. Samiec mutant *mosaic*, ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w błonie bazalnej (długa strzałka) oraz w błonie apikalnej (krótka strzałka). D. Samiec mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 , ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w błonie apikalnej (krótka strzałka), a także w cytoplazmie (długa strzałka); analizę przeprowadzono u: n=6 osobników o genotypie dzikim; n=4 osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ; n=6 mutantów *mosaic*; n=7 mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ; białko CTR1 znakowane fluorochromem Cy3 (czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski); skala bar = 20 μm .

7. 4. 2. 2 Analiza komórkowej lokalizacji białka CTR1 w części rdzennej nerki – osobniki 14-dniowe

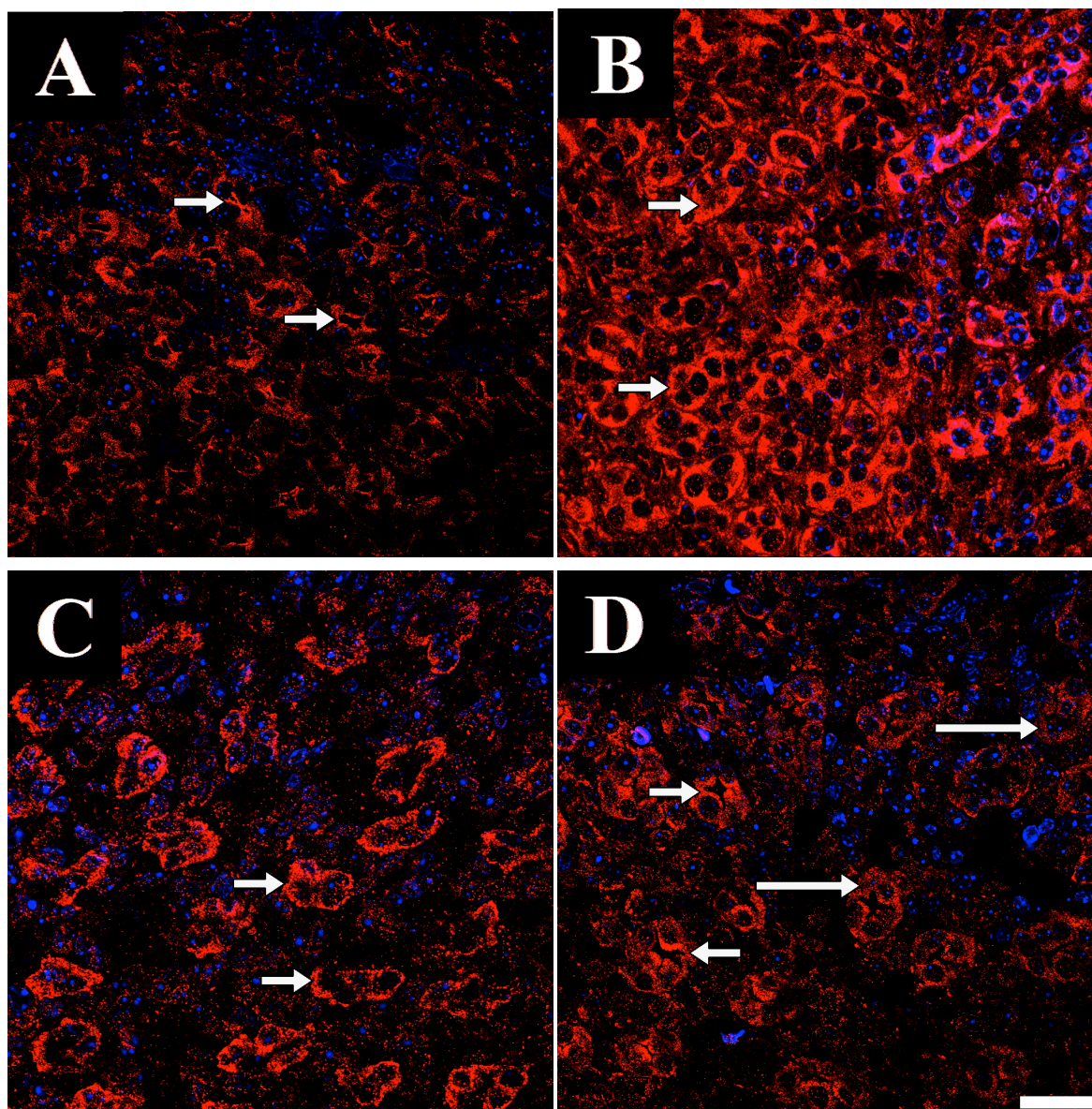
Analiza immunofluorescencyjna wykazała ekspresję białka CTR1 również w obrębie rdzenia nerki u wszystkich badanych grup myszy 14-dniowych, jednak znaleziono różnice w lokalizacji wewnątrzkomórkowej badanego białka pomiędzy analizowanymi grupami.

Reakcja wykonana na skrawkach nerki pochodzących od myszy 14-dniowych o genotypie dzikim (+/-(14)) wykazała, że białko CTR1 zlokalizowane jest w obrębie rdzenia nerki, w komórkach nabłonkowych odcinka nefronu odpowiadających pętli Henlego. Białko CTR1 zlokalizowane jest w błonie apikalnej tych komórek (Fot. 7A, strzałka).

W nerkach pochodzących od 14-dniowych myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) (+/-Cu(14)) ekspresję białka CTR1 znaleziono również w komórkach nabłonka pętli Henlego. Badane białko zlokalizowane zostało w cytoplazmie tych komórek (Fot. 7B, strzałka), co sugeruje jego internalizację.

Reakcja immunofluorescencyjna wykonana na skrawkach nerek pochodzących od 14-dniowych mutantów *mosaic* (ms/-(14)) wykazała, że białko CTR1 zlokalizowane jest w błonie bazalnej komórek pętli Henlego (Fot. 7C, strzałka).

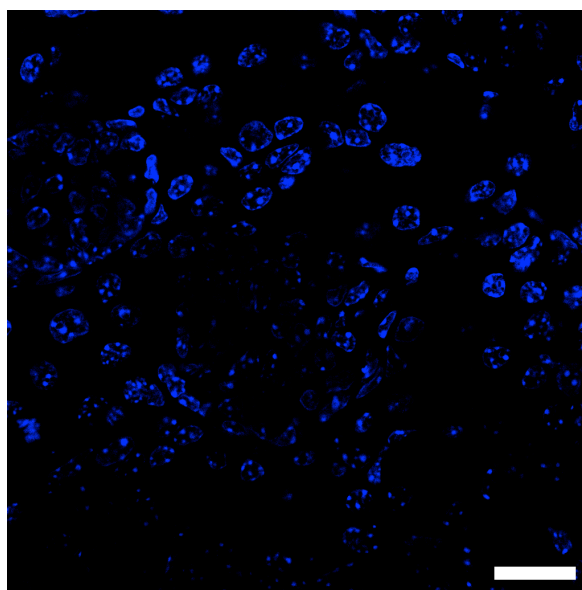
W nerkach 14-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ (ms/-Cu(14)) białko CTR1 również wykazuje ekspresję w komórkach pętli Henlego i jest zlokalizowane ono w błonie apikalnej (Fot. 7D, krótka strzałka). Stwierdzono również, że białko to częściowo zlokalizowane jest w obrębie cytoplazmy komórek pętli Henlego, co może sugerować, że ulega ono internalizacji (Fot. 7D, długa strzałka).



Fot. 7. Ekspresja białka CTR1 w rdzeniu nerki samców 14-dniowych. A. Osobnik kontrolny, ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach pętli Henlego w błonie apikalnej (strzałka). B. Osobnik o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 , ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach pętli Henlego w cytoplazmie (strzałka). C. Samiec mutant *mosaic*, ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach pętli Henlego w błonie bazalnej (strzałka). D. Samiec mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 , ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach pętli Henlego w błonie apikalnej (krótka strzałka), a także w cytoplazmie (długa strzałka); analizę przeprowadzono u: $n=6$ osobników o genotypie dzikim; $n=4$ osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ; $n=6$ mutantów *mosaic*; $n=7$ mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ; białko CTR1 znakowane fluorochromem Cy3 (czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski); skala bar = 20 μm .

W celu potwierdzenia, że używane do reakcji immunofluorescencji przeciwciała pierwszorzędowe, wiążące się do białka CTR1, wiążą się specyficznym z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym wykonano reakcję, w której zamiast przeciwciała

pierwszorzędowego na skrawki nałożono roztwór 3% BSA w PBS. Skrawki takie inkubowano całą noc w temperaturze pokojowej w komorze mokrej, a następnie płukano i nakładano przeciwciała drugorzędowe. Preparaty następnie płukano, tak jak opisano w podrozdziale 7. 3. 4. 2, a następnie zamykano używając medium (Vectashield) zawierające DAPI. Na preparatach takich nie obserwowano sygnału immunopozytywnego, co wskazuje, że przeciwciała drugorzędowe łączy się specyficznie z użytym przeciwciałem pierwszorzędowym. W przypadku braku przeciwciała pierwszorzędowego niezwiązane przeciwciała drugorzędowe zostaje odpłukane.



Fot. 8. Nerka osobnika 14-dniowego o genotypie dzikim – próba negatywna; brak sygnału pochodzącego od fluorochromu Cy3, jądra komórkowe wybarwione DAPI; skala bar = 20 μ m.

7. 4. 2. 3. Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w nerkach, kolokalizacja białka CTR1 oraz białka AQP1 - osobniki 14-dniowe

Wyniki otrzymane w opisanych powyżej reakcjach immunofluorescencyjnych wykazały, że w korze nerki ekspresja białka CTR1 zachodzi w komórkach kanalików nerkowych. W celu określenia, w którym odcinku nefronu zachodzi ekspresja badanego białka użyto markera dla kanalików proksymalnych, białka akwaporyny 1 (AQP1) i wykonano reakcję kolokalizacji obu białek, białka CTR1 oraz białka AQP1, na skrawkach mrożeniowych pochodzących z nerek od wszystkich badanych grup myszy 14-dniowych.

Do reakcji wykorzystano przeciwciała pierwszorzędowe:

- przeciwciało wyprodukowane w króliku i skierowane przeciwko białku CTR1 (Tab. 13.)
- przeciwciało wyprodukowane w kozie i skierowane przeciwko białku AQP1 (Tab. 13.)

oraz przeciwciała drugorzędowe:

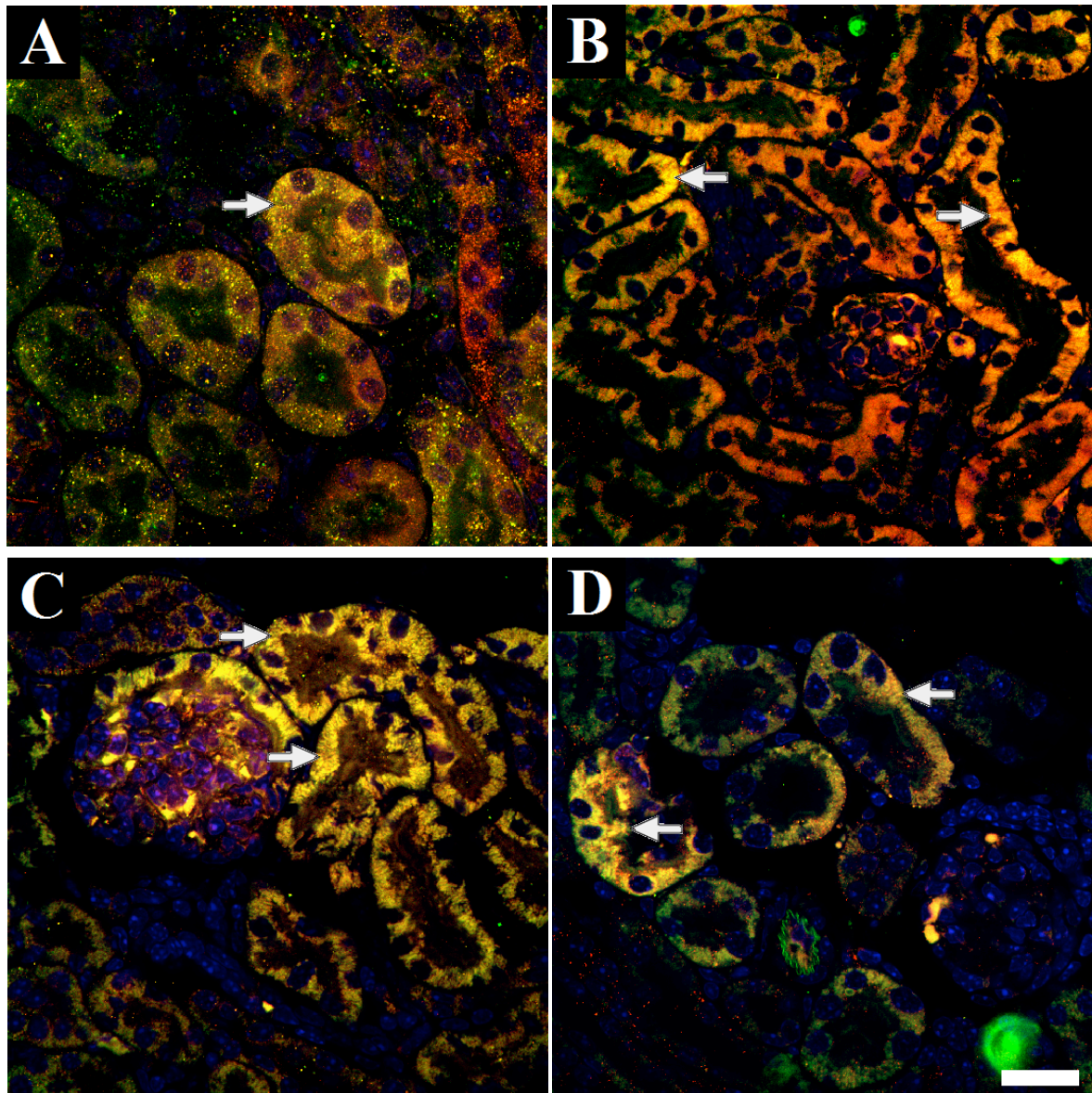
- przeciwciało anty-królicze wyprodukowane w kozie i sprzężone z fluorochromem Cy3 (Tab. 14.) – sygnał czerwony
- przeciwciało anty-kozie wyprodukowane w ośle i sprzężone z fluorochromem Alexa Fluor488 (Tab. 14.) – sygnał zielony.

Przeprowadzona reakcja kolokalizacji białek CTR1 oraz AQP1 w komórkach nerek 14-dniowych osobników o genotypie dzikim (+/-(14)), wykazała, że białko CTR1 zlokalizowane jest głównie w obrębie komórek kanalików proksymalnych (Fot. 9A, strzałka).

Badanie kolokalizacji białka CTR1 oraz AQP1 w nerkach 14-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(14)) wykazało, że ekspresja badanego białka zachodzi również w komórkach kanalików proksymalnych (Fot. 9B, strzałka). Ponadto sygnały pochodzące od obu białek w komórkach kanalików proksymalnych ściśle się pokrywały, co wskazuje na cytoplazmatyczną lokalizację białka CTR1 w tych komórkach. Równocześnie wynik ten potwierdza, że w nerkach myszy (+/-Cu(14)), w komórkach kanalików proksymalnych białko to ulega internalizacji do cytoplazmy (Fot. 9B, strzałka).

Podobnie, w nerkach obu grup mutantów *mosaic* (ms/-(14)) (Fot. 9C, strzałka) oraz (ms/-Cu(14)) (Fot. 9D, strzałka) białko CTR1 zlokalizowane jest w obrębie komórek kanalików proksymalnych.

Otrzymane opisanych wyżej reakcji wyniki wykazały, że ekspresja białka CTR1 w korze nerki u wszystkich grup myszy 14-dniowych zachodzi w początkowej części nefronu odpowiadającej odcinkom kanalików proksymalnych.



Fot. 9. Kolokalizacja białka CTR1 oraz AQP1 w korze nerki samców 14-dniowych. białko CTR1 znakowane fluorochromem Cy3 (czerwony), białko AQP1 znakowane fluorochromem Alexa Fluor48; A. Osobnik kontrolny, ekspresja białek CTR1 i AQP1 widoczna w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych (strzałka). B. Osobnik o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 , ekspresja białek CTR1 i AQP1 widoczna w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych (strzałka). C. Samiec mutant *mosaic*, ekspresja białek CTR1 i AQP1 widoczna w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych (strzałka). D. Samiec mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 , ekspresja białek CTR1 i AQP1 widoczna w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych (strzałka); analizę przeprowadzono u: n=4 osobników o genotypie dzikim; n=4 osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ; n=4 mutantów *mosaic*; n=4 mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ; jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski); skala bar = 20 μm ..

7. 4. 3. Analiza poziomu ekspresji białka CTR1 w nerkach – osobniki 14-dniowe

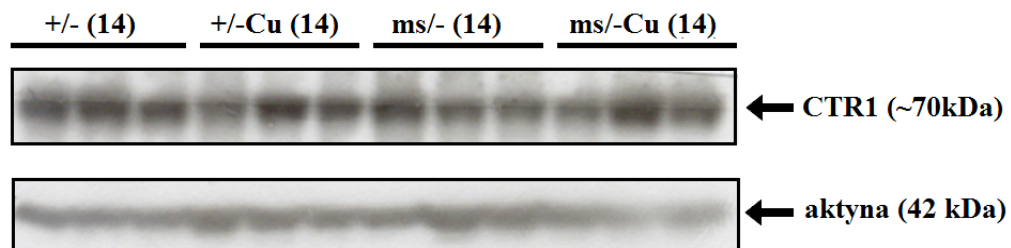
Białko CTR1 w postaci monomeru (o masie cząsteczkowej około 35 kDa) nie ma zdolności do transportu jonów w miedzi. Białko to, aby pełnić rolę transportera, ulega procesowi homooligomeryzacji, dzięki czemu utworzona zostaje aktywna forma homotrimeru (o masie cząsteczkowej około 70 kDa). W postaci homotrimeru białko to wbudowywane jest w błonę komórkową, gdzie tworzy przestrzenną strukturę kanału, przez który transportowane są do wnętrza komórki jednowartościowe jony miedzi (De Feo i wsp. 2009).

W obecnej pracy nie ograniczono się tylko do immunofluorescencyjnej lokalizacji białka CTR1 w nerkach badanych myszy, ale używając metody Western blot przeprowadzono analizy ilościowe pozwalające na porównanie poziomu ekspresji białka CTR1 w nerkach u zwierząt wszystkich badanych grup. W tym celu przygotowano ekstrakty białkowe z nerek, a następnie podzielono je na frakcję błonową oraz cytoplazmatyczną. Do analizy ekspresji białka CTR1 wykorzystywano ekstrakty pochodzące z frakcji błonowych. Używane do reakcji próbki nie podlegały procesowi denaturacji cieplnej. Ilościowej analizie poddano tylko prążek o masie 70 kDa, który odpowiadał formie homotrimeru białka CTR1, gdyż, jak wspomniano wcześniej, jest to forma odpowiadająca za transport jonów miedzi do wnętrza komórki. Za pomocą programu komputerowego (Quantity One, BioRad) wykonano analizy densytometryczne, dzięki którym określono zmiany poziomu ekspresji białka CTR1 uwidocznione na membranach. Następnie przeprowadzono odpowiednie analizy statystyczne, które pozwoliły na określenie różnic statystycznie istotnych w poziomie ekspresji białka CTR1 pomiędzy badanymi grupami. Jako białka referencyjnego użyto białka aktyny o masie cząsteczkowej 42 kDa.

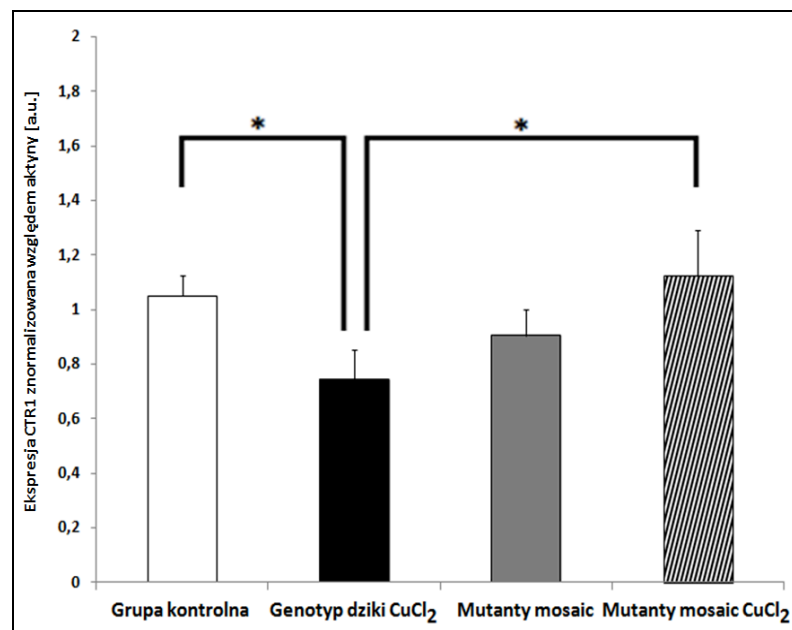
Metodą Western blot wykazano, że białko CTR1 ma ekspresję w nerkach u wszystkich badanych grup myszy 14-dniowych (Ryc. 5A). W celu określenia poziomu ekspresji białka CTR1 wykonano analizę densytometryczną prążków membrany PVDF zlokalizowanych na wysokości około 70 kDa, a wyniki tej analizy przedstawiono na rycinie 5B (Ryc. 5B). Przeprowadzona analiza densytometryczna wykazała obniżoną ekspresję homotrimeru białka CTR1 w grupie osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(14)) w porównaniu do osobników kontrolnych (+/-(14)). Nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w poziomie ekspresji białka CTR1 pomiędzy grupą kontrolną, a mutantami *mosaic* niepoddanymi terapii CuCl_2 (ms/- (14)). Podobne wyniki otrzymano porównując poziom ekspresji białka CTR1 pomiędzy grupą kontrolną (+/-(14)), a grupą mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (ms/-Cu(14)). Otrzymane wyniki wskazują na istotne statystycznie różnice w poziomie ekspresji białka CTR1 pomiędzy grupą myszy o

genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(14)), a grupą mutantów poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) (ms/-Cu(14)). Ekspresja białka CTR1 była istotnie statystycznie wyższa u myszy mutantów (ms/-Cu(14)). Porównując poziom ekspresji białka CTR1 pomiędzy obiema grupami badanych mutantów *mosaic* również nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic (Ryc. 5.B).

A.



B.

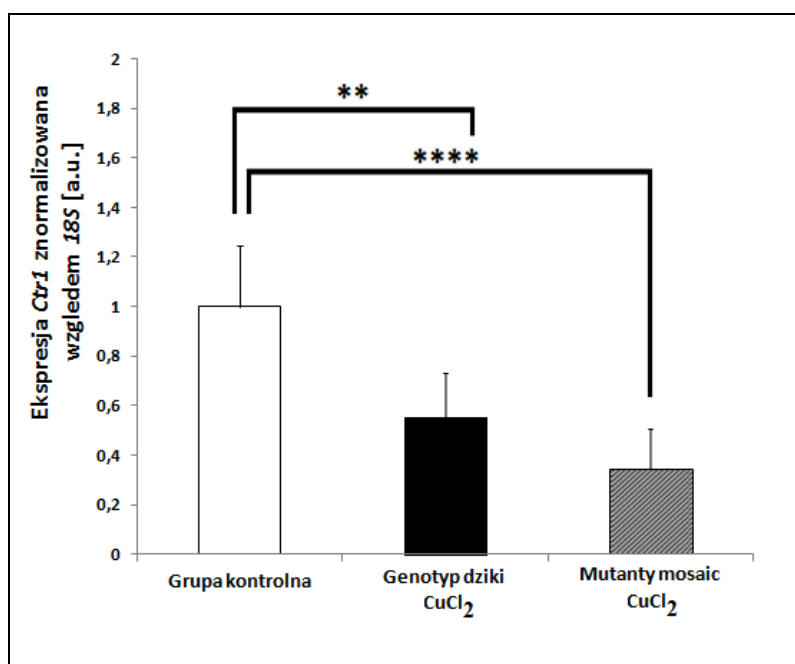


Ryc. 5. Ekspresja białka CTR1 w nerkach myszy 14-dniowych. A. Wyniki analizy przeprowadzone z użyciem metody Western blot. Na membranie widoczny jest prążek na wysokości około 70 kDa odpowiadający homotrimerycznej formie białka CTR1. Jako białka referencyjnego użyto aktyny (42 kDa). Do analiz wykorzystano ekstrakty błonowe z nerek pochodzących od trzech osobników z każdej badanej grupy: osobników o genotypie dzikim (+/-(14)), o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(14)), mutantów *mosaic* (ms/-(14)), mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (ms/-Cu(14)). B. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji homotrimerycznej formy białka CTR1 u poszczególnych grup badanych myszy: osobników o genotypie dzikim, n=3; o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=3; mutantów *mosaic*, n=3; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=3. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice: *P<0,05.

7. 4. 4. Analiza poziomu ekspresji genu *Ctrl* w nerkach – osobniki 46-dniowe

W celu sprawdzenia, czy długotrwałe podawanie chlorku miedzi (II) ma wpływ na ekspresję badanego genu oraz białka badano również poziom ekspresji genu i białka *Ctrl*/CTR1 w nerkach u myszy 46-dniowych.

W reakcji real time PCR oznaczono poziom transkryptu genu *Ctrl* w poszczególnych grupach badanych zwierząt 46-dniowych. Analizując otrzymane wyniki stwierdzono, że u myszy dzikich otrzymujących suplementację chlorku miedzi (II) poziom ekspresji genu *Ctrl* był niższy niż u osobników grupy kontrolnej. Podawanie chlorku miedzi (II) wpłynęło również na obniżenie ekspresji genu *Ctrl* u mutantów *mosaic* poddanych iniekcji CuCl_2 w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie stwierdzono natomiast różnic statystycznie istotnych w poziomie ekspresji badanego genu pomiędzy osobnikami z grupy +/-Cu(46) oraz osobnikami z grupy ms/-Cu(46) (Wyk. 12).



Wyk. 12. Zmiany poziomu ekspresji genu *Ctrl* w nerkach 46-dniowych: samców o genotypie dzikim, n=6; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=6; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=7. Poziom ekspresji znormalizowano względem ekspresji genu *18S*. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice (ANOVA dwuczynnikowa): ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$.

7. 4. 5. Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w obrębie kory i rdzenia nerki – osobniki 46-dniowe

Przeprowadzona na skrawkach mrożeniowych nerek pochodzących od zwierząt 46-dniowych reakcja immunofluorescencyjna wykazała ekspresję białka CTR1 w nerkach u wszystkich badanych grup.

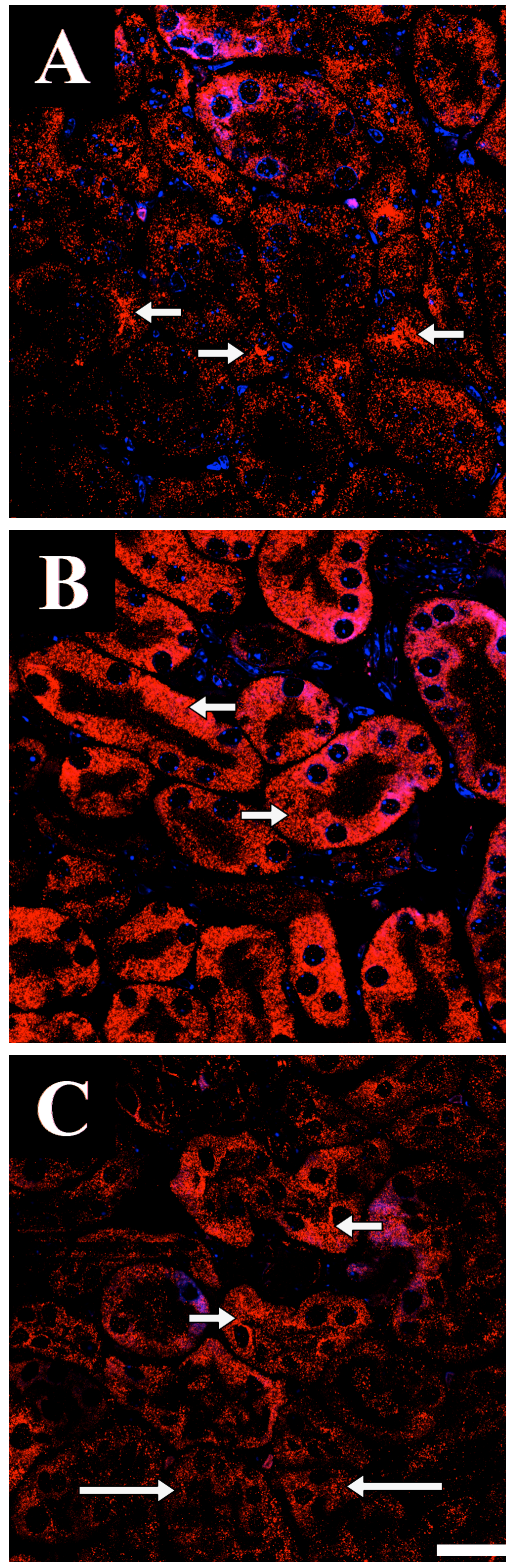
7. 4. 5. 1 Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w części korowej nerki – osobniki 46-dniowe

Analiza immunofluorescencyjna wykazała ekspresję białka CTR1 w korze nerki u wszystkich badanych grup zwierząt 46-dniowych.

U 46-dniowych osobników o genotypie dzikim ekspresję białka CTR1 stwierdzono w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych. W komórkach kanalika proksymalnego tych myszy białko CTR1 zlokalizowane było w błonie apikalnej (Fot. 10A, strzałka).

Analiza lokalizacji białka CTR1 w nerkach pochodzących od myszy 46-dniowych o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 wykazała, że białko CTR1 zlokalizowane jest w obrębie cytoplazmy komórek nabłonkowych kanalików nerkowych (Fot. 10B, strzałka).

W nerkach 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ekspresję białka CTR1 stwierdzono w komórkach kanalików nerkowych (Fot. 10C). Białko to zlokalizowane było zarówno w błonie apikalnej (Fot. 10C, krótka strzałka), jak również w obrębie cytoplazmy (Fot. 10C, długa strzałka) komórek nabłonkowych kanalików nerkowych. Lokalizacja białka CTR1 w cytoplazmie może wskazywać na jego internalizację.



Fot. 10. Ekspresja białka CTR1 w korze nerki samców 46-dniowych. A. Osobnik kontrolny, ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w błonie apikalnej (strzałka). B. Osobnik o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 , ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w cytoplazmie (strzałka). C. Samiec mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 , ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w błonie apikalnej (krótka strzałka), a także w cytoplazmie (długa strzałka); analizę przeprowadzono u: $n=4$ osobników o genotypie dzikim; $n=5$ osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ; $n=5$ mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ; białko CTR1 znakowane fluorochromem Cy3 (czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski); skala bar = 20 μm .

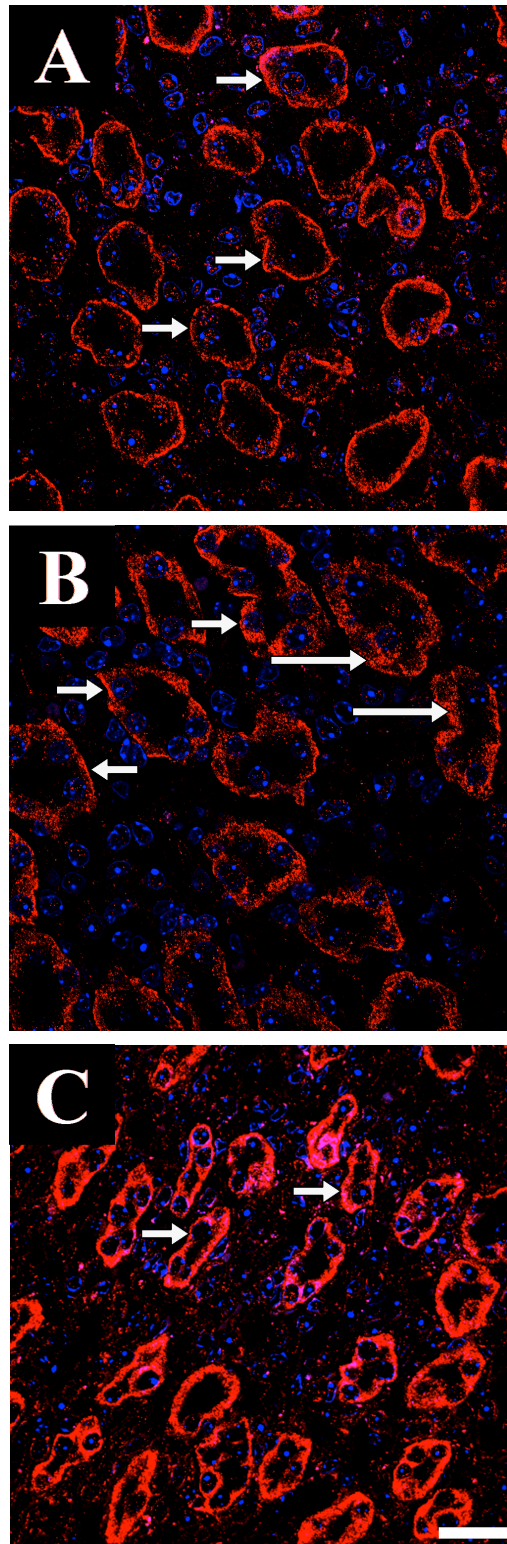
7. 4. 5. 2 Analiza komórkowej lokalizacji białka CTR1 w części rdzennej nerki – osobniki 46-dniowe

Analiza immunofluorescencyjna wykazała ekspresję białka CTR1 w rdzeniu nerki u wszystkich badanych grup zwierząt 46-dniowych.

Analiza immunofluorescencyjna pokazała, że u 46-dniowych osobników o genotypie dzikim +/- (46) ekspresja białka CTR1 zachodzi w komórkach pętli Henlego (Fot. 11A). Na przekrojach nerek obserwowano ekspresję tego białka w błonie bazalnej komórek pętli Henlego (Fot. 11A, strzałka).

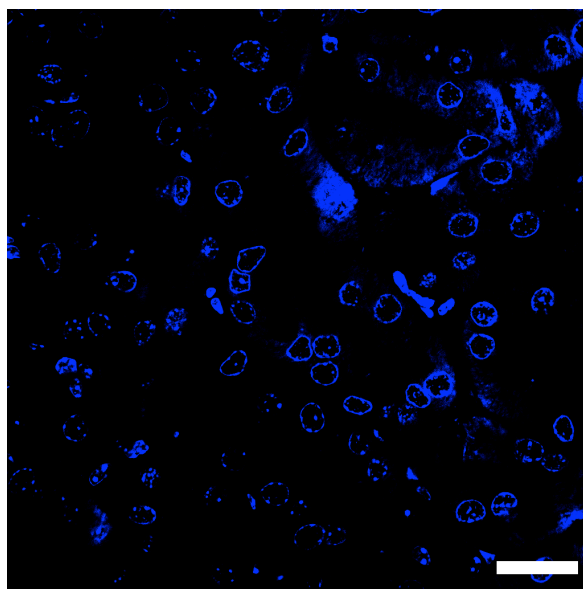
Reakcja immunofluorescencyjna przeprowadzona na skrawkach nerek pochodzących od 46-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 wykazała, że białko CTR1 zlokalizowane jest w błonie bazalnej (Fot. 11B, krótka strzałka), jak również w obrębie cytoplazmy komórek pętli Henlego (Fot. 11B, długa strzałka), co może wskazywać na jego internalizację.

Wyniki reakcji immunofluorescencyjnej wskazują, że w obrębie rdzenia nerek pochodzących od 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 białko CTR1 zlokalizowane jest w błonie bazalnej komórek pętli Henlego (Fot. 11C, strzałka).



Fot. 11. Ekspresja białka CTR1 w rdzeniu nerki samców 46-dniowych. A. Osobnik kontrolny, ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach pętli Henlego w błonie bazalnej (strzałka). B. Osobnik o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 , ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach pętli Henlego w błonie bazalnej (strzałka). C. Samiec mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 , ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach pętli Henlego w błonie bazalnej (strzałka); analizę przeprowadzono u: $n=4$ osobników o genotypie dzikim; $n=5$ osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ; $n=5$ mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ; białko CTR1 znakowane fluorochromem Cy3 (czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski); skala bar = 20 μm .

W celu potwierdzenia specyficzności wiązania użytego w reakcji immunofluorescencji przeciwciała pierwszorzędowego z przeciwciałem drugorzędowym wykonano reakcję tak jak to opisano w podrozdziale 8. 4. 2. 2. Na tak przygotowanych preparatach nie obserwowano sygnału immunopozytywnego, co wskazuje na specyficzne wiązanie pomiędzy przeciwciałem pierwszorzędowym oraz drugorzędowym (Fot. 12).



Fot. 12. Nerka osobnika 46-dniowego o genotypie dzikim – próba negatywna; brak sygnału pochodzącego od fluorochromu Cy3, jądra komórkowe wybarwione DAPI; skala bar = 20 μ m.

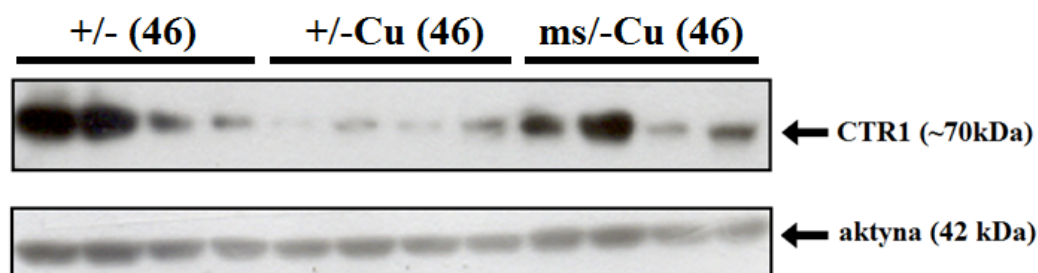
7. 4. 6. Analiza poziomu ekspresji białka CTR1 w nerkach – osobniki 46-dniowe

Przeprowadzając reakcję Western blot porównano poziom ekspresji białka CTR1 w nerkach pomiędzy trzema badanymi grupami osobników 46-dniowych. W reakcji wykorzystano ekstrakty białkowe pochodzące z frakcji błonowych nerek. Użyte do reakcji białko nie poddawano denaturacji termicznej. Podobnie, jak w przypadku myszy 14-dniowych analizowano tylko prążek odpowiadający 70 kDa, który wskazywał na obecność aktywnej formy homotrimeru CTR1. Jako białka referencyjnego użyto aktyny o masie cząsteczkowej 42 kDa.

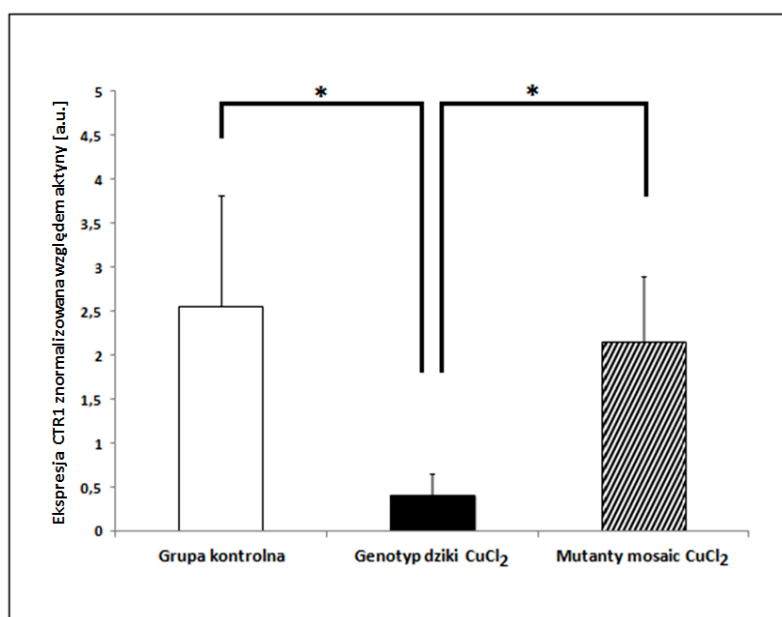
Wyniki analiz wykazały, że białko CTR1 wykazuje ekspresję w nerkach u wszystkich badanych grup zwierząt 46-dniowych (Ryc. 6A). W celu określenia poziomu ekspresji białka CTR1 wykonano analizę densytometryczną prążków membrany PVDF zlokalizowanych na wysokości około 70 kDa. Otrzymane wyniki wskazują, że ekspresja białka CTR1 w nerkach

46-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(46)) jest obniżona zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej (+/-(46)), jak i do grupy mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (ms/-Cu(46)). Nie wykazano różnic statystycznie istotnych w poziomie białka CTR1 w nerkach pomiędzy grupą osobników kontrolnych (+/-(46)), a grup mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (Ryc. 6B).

A.



B.

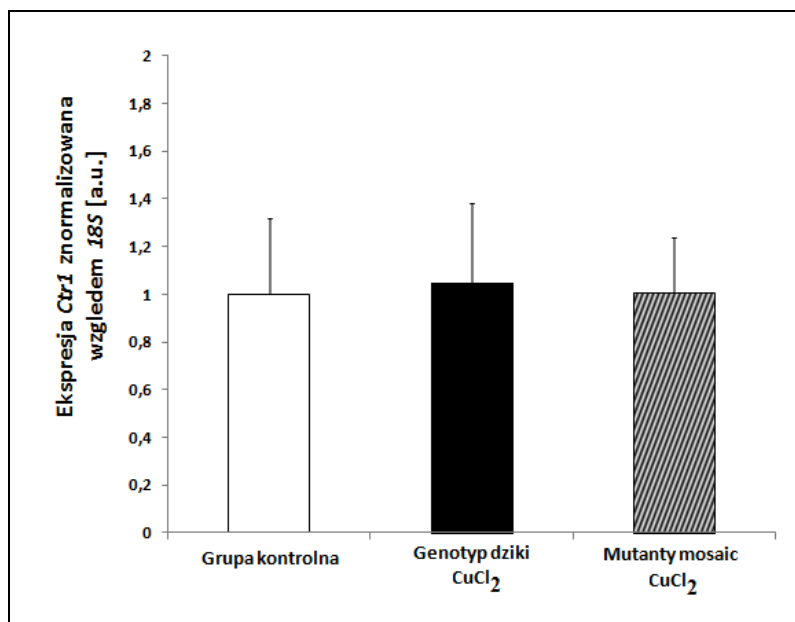


Ryc. 6. Ekspresja białka CTR1 w nerkach myszy 46-dniowych. A. Wyniki analizy przeprowadzone z użyciem metody Western blot. Na membranie widoczny jest prążek na wysokości około 70 kDa odpowiadający homotrimerycznej formie białka CTR1. Jako białka referencyjnego użyto aktyny (42 kDa). Do analiz wykorzystano ekstrakty błonowe z nerek pochodzących od czterech osobników z każdej badanej grupy: osobników o genotypie dzikim (+/-(46)), o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(46)), mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (ms/-Cu(46)). B. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji homotrimerycznej formy białka CTR1 u poszczególnych grup badanych myszy: osobników o genotypie dzikim, n=4; o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=4; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=4. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice: *P<0,05.

7. 4. 7. Analiza poziomu ekspresji genu *Ctrl* w nerkach – osobniki 6 miesięczne

Wykorzystanie myszy 6 miesięcznych o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic*, które w ciągu pierwszych 44 dni życia otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II), miało na celu sprawdzenie długotrwałego efektu suplementacji CuCl_2 na ekspresję genu i białka *Ctrl*/CTR1.

Wyniki uzyskane w reakcji real time PCR wykazały, że poziom ekspresji genu *Ctrl* w nerkach jest podobny u wszystkich trzech badanych grup osobników 6 miesięcznych +/- (6), +/-Cu(6) i ms/-Cu(6) (Wyk. 13).



Wyk. 13. Zmiany poziomu ekspresji genu *Ctrl* w nerkach 6 miesięcznych: samców o genotypie dzikim, n=7; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=7; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=6. Poziom ekspresji znormalizowano względem ekspresji genu *18S*. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD.

7. 4. 8. Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w obrębie kory i rdzenia nerki – osobniki 6 miesięczne

Przeprowadzone analizy wykonane za pomocą metody immunofluorescencyjnej wykazały, że białko CTR1 wykazuje ekspresję w nerkach u wszystkich grup badanych osobników 6 miesięcznych.

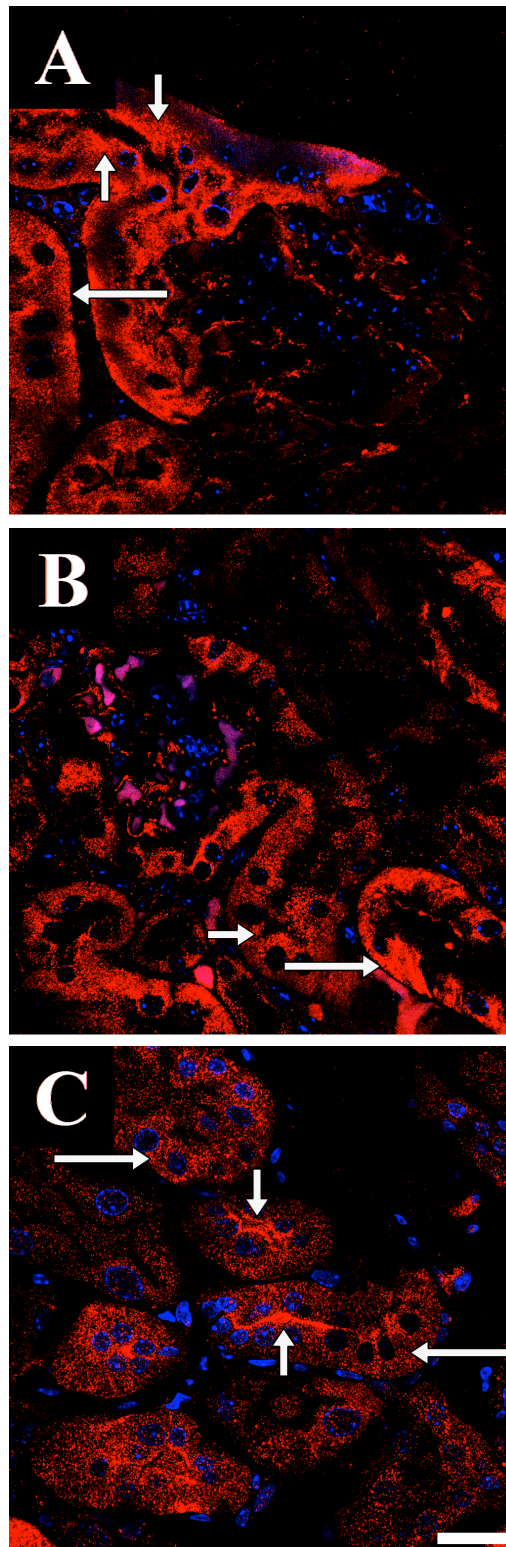
7. 4. 8. 1 Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w części korowej nerki – osobniki 6 miesięczne

Analiza immunofluorescencyjna wykazała ekspresję białka CTR1 w korze nerki u wszystkich badanych grup zwierząt 6 miesięcznych.

Analiza immunofluorescencyjna wykazała, że w korze nerki osobników 6 miesięcznych o genotypie dzikim białko CTR1 zlokalizowane jest zarówno w apikalnej błonie (Fot. 13A, krótka strzałka), jak również w błonie bazalnej (Fot. 13A, długa strzałka) komórek nabłonkowych kanalików nerkowych. Szczególnie silny immunopozytywny sygnał obserwowano w początkowym odcinku kanalików proksymalnych.

Podobną lokalizację białka CTR1, jak u osobników kontrolnych stwierdzono również w nerkach pochodzących od 6 miesięcznych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , gdzie badane białko przyjmuje lokalizację w błonie apikalnej (Fot. 13B, krótka strzałka), jak również w błonie bazalnej (Fot. 13B, długa strzałka) komórek nabłonkowych kanalików nerkowych.

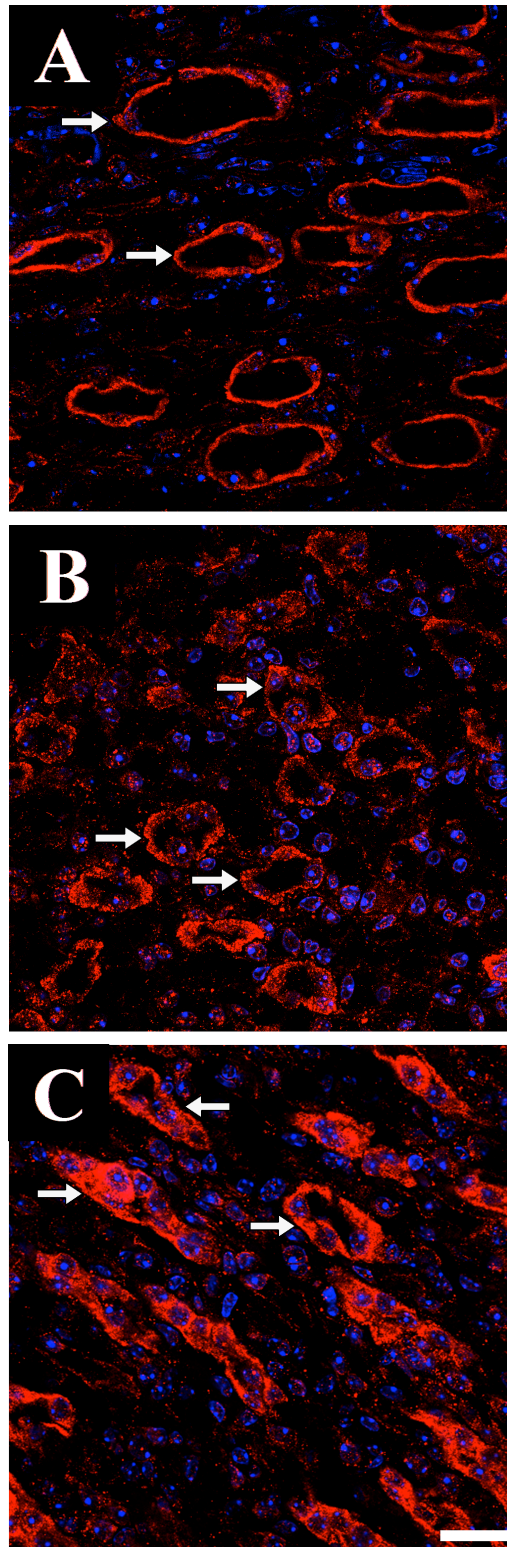
Na skrawkach nerek pochodzących od 6 miesięcznych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 obserwowano bardzo silny, immunopozytywny sygnał świadczący o lokalizacji białka CTR1 w obrębie błony apikalnej (Fot. 13C, krótka strzałka) komórek kanalików nerkowych. Jednocześnie u tych osobników ekspresję białka CTR1 stwierdzono również w obrębie cytoplazmy tych komórek, co może wskazywać na jego internalizację (Fot. 13C, długa strzałka).



Fot. 13. Ekspresja białka CTR1 w korze nerki samców 6 miesięcznych. A. Osobnik kontrolny, ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w błonie apikalnej (krótka strzałka) oraz w błonie bazalnej (długa strzałka). B. Osobnik o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 , ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w błonie apikalnej (krótka strzałka) oraz w błonie bazalnej (długa strzałka). C. Samiec mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 , ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w błonie apikalnej (krótka strzałka), a także w cytoplazmie (długa strzałka); analizę przeprowadzono u: n=6 osobników o genotypie dzikim; n=8 osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ; n=6 mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ; białko CTR1 znakowane fluorochromem Cy3 (czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski); skala bar = 20 μm .

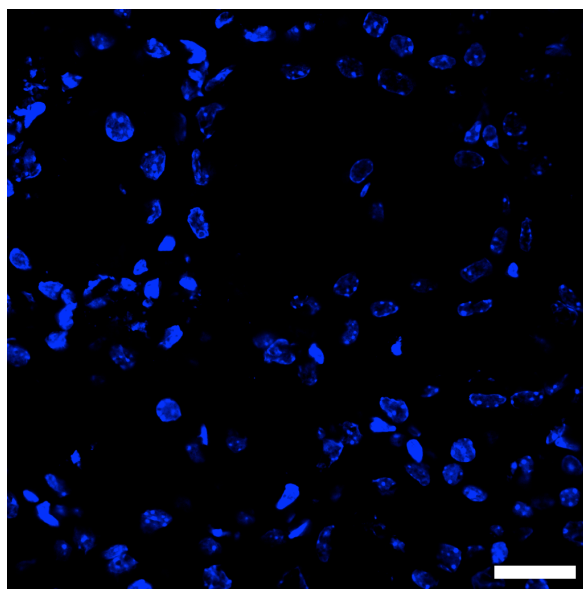
7. 4. 8. 2 Analiza komórkowej lokalizacji białka CTR1 w części rdzennej nerki – osobniki 6 miesięczne

Analiza immunofluorescencyjna wykazała ekspresję białka CTR1 w rdzeniu nerki u wszystkich badanych grup zwierząt 6 miesięcznych. Badania przeprowadzone metodą immunofluorescencyjną wykazały, że ekspresja białka CTR1 w rdzeniu nerek osobników 6 miesięcznych jest bardzo podobna u wszystkich badanych grup i obserwowano ją w komórkach pętli Henlego. W komórkach tych białko CTR1 zlokalizowane było w obrębie błony bazalnej (Fot. 14A-C, strzałki). Niezwykle silną ekspresję białka CTR1 w błonie bazalnej komórek pętli Henlego odnotowano w przypadku nerek pochodzących od 6 miesięcznych mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) (Fot. 14C, strzałki).



Fot. 14. Ekspresja białka CTR1 w rdzeniu nerki samców 6 miesięcznych. A. Osobnik kontrolny, ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach pętli Henlego w błonie bazalnej (strzałka). B. Osobnik o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 , ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach pętli Henlego w błonie bazalnej (strzałka). C. Samiec mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 , ekspresja białka CTR1 widoczna w komórkach pętli Henlego w błonie bazalnej (strzałka); analizę przeprowadzono u: n=6 osobników o genotypie dzikim; n=8 osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ; n=6 mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ; białko CTR1 znakowane fluorochromem Cy3 (czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski); skala bar = 20 μm .

W celu potwierdzenia specyficzności wiązania użytego w reakcji immunofluorescencji przeciwciała pierwszorzędowego z przeciwciałem drugorzędowym wykonano reakcję tak jak to opisano w podrozdziale 8. 4. 2. 2. Na tak przygotowanych preparatach nie obserwowano sygnału immunopozytywnego, co wskazuje na specyficzne wiązanie pomiędzy przeciwciałem pierwszorzędowym oraz drugorzędowym (Fot. 15).



Fot. 15. Nerka osobnika 6 miesięcznego o genotypie dzikim – próba negatywna; brak sygnału pochodzącego od fluorochromu Cy3, jądra komórkowe wybarwione DAPI; skala bar = 20 μ m.

7. 4. 8. 3. Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1 w nerkach, kolokalizacja białka CTR1 oraz białka AQP1 - osobniki 6 miesięczne

Wyniki otrzymane w opisanych powyżej reakcjach immunofluorescencyjnych wykazały, że w korze nerki ekspresja białka CTR1 zachodzi w komórkach kanalików nerkowych. W celu określenia, w którym odcinku nefronu zachodzi ekspresja badanego białka użyto markera dla kanalików proksymalnych, białka akwaporyny 1 (AQP1). Wykonano reakcję kolokalizacji obu białek, białka CTR1 oraz białka AQP1, na skrawkach mrożeniowych pochodzących z nerek od wszystkich badanych grup myszy 6 miesięcznych.

Do reakcji wykorzystano przeciwciała pierwszorzędowe:

- przeciwciało wyprodukowane w króliku i skierowane przeciwko białku CTR1 (Tab. 13.)
 - przeciwciało wyprodukowane w kozie i skierowane przeciwko białku AQP1 (Tab. 13.)
- oraz przeciwciała drugorzędowe:

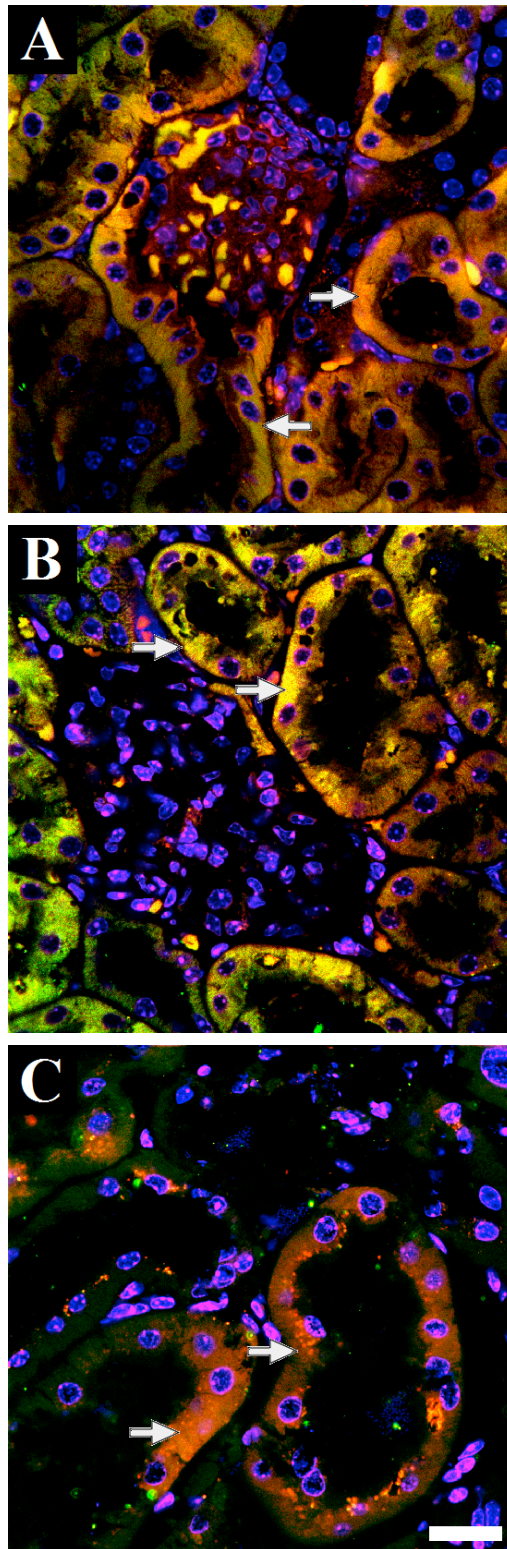
- przeciwciało anty-królicze wyprodukowane w kozie i sprzężone z fluorochromem Cy3 (Tab. 14.) – sygnał czerwony
- przeciwciało anty-kozie wyprodukowane w ośle i sprzężone z fluorochromem Alexa Fluor488 (Tab. 14.) – sygnał zielony.

Analiza kolokalizacji białka CTR1 oraz AQP1 u 6 miesięcznych osobników o genotypie dzikim potwierdziła, że białko CTR1 zlokalizowane jest w komórkach kanalików proksymalnych (Fot. 16A, strzałki).

Analizy komórkowej lokalizacji białka CTR1 oraz AQP1 uzyskane w reakcji immunofluorescencyjnej przeprowadzonej na skrawkach nerek 6 miesięcznych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 również potwierdziły lokalizację badanego białka w komórkach kanalików proksymalnych (Fot. 16B, strzałki).

Podobny wzór ekspresji wskazujący na lokalizację białek CTR1 oraz AQP1 w obrębie proksymalnego odcinka kanalików nerkowych zaobserwowano na skrawkach nerek pochodzących od 6 miesięcznych samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (Fot. 16C, strzałki).

Otrzymane opisanych wyżej reakcji wyniki wykazały, że ekspresja białka CTR1 w korze nerki u wszystkich grup myszy 6 miesięcznych zachodzi w początkowej części nefronu odpowiadającej odcinkom kanalików proksymalnych.

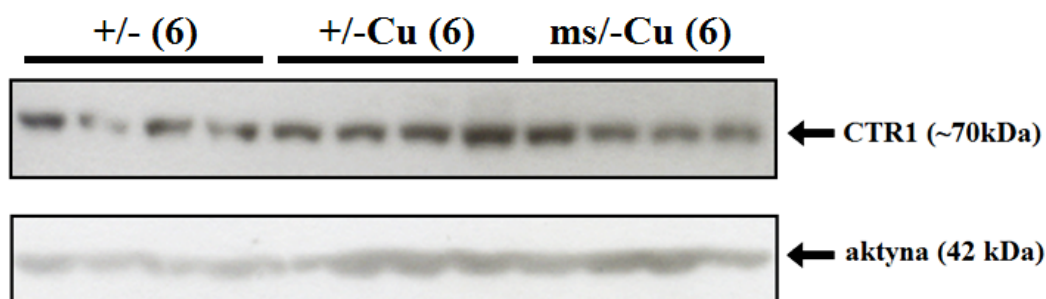


Fot. 16. Kolokalizacja białka CTR1 oraz AQP1 w korze nerki samców 6 miesięcznych. białko CTR1 znakowane fluorochromem Cy3 (czerwony), białko AQP1 znakowane fluorochromem Alexa Fluor48; A. Osobnik kontrolny, ekspresja białek CTR1 i AQP1 widoczna w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych (strzałka). B. Osobnik o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 , ekspresja białek CTR1 i AQP1 widoczna w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych (strzałka). C. Samiec mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 , ekspresja białek CTR1 i AQP1 widoczna w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych (strzałka); analizę przeprowadzono u: n=4 osobników o genotypie dzikim; n=4 osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ; n=4 mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ; jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski); skala bar = 20 μm .

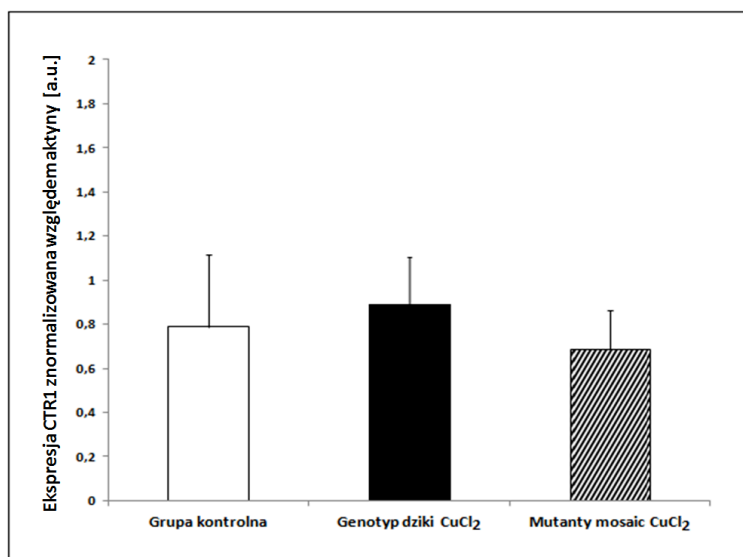
7. 4. 9. Analiza poziomu ekspresji białka CTR1 w nerkach – osobniki 6 miesięczne

Wyniki analiz przeprowadzonych metodą Western blot potwierdziły ekspresję białka CTR1 w nerkach osobników u wszystkich badanych grup osobników 6 miesięcznych. W celu określenia poziomu ekspresji badanego białka wykonano analizę densytometryczną prążków membrany PVDF zlokalizowanych na wysokości około 70 kDa, które odpowiadają aktywnej formie homotrimeru białka CTR1 (Ryc. 7A). Jako białka referencyjnego użyto aktyny o masie cząsteczkowej 42 kDa. Przeprowadzone analizy densytometryczne ekspresji białka CTR1 nie wykazały statystycznie istotnych różnic w poziomie ekspresji białka CTR1 pomiędzy badanymi grupami zwierząt (Ryc. 7B).

A.



B.



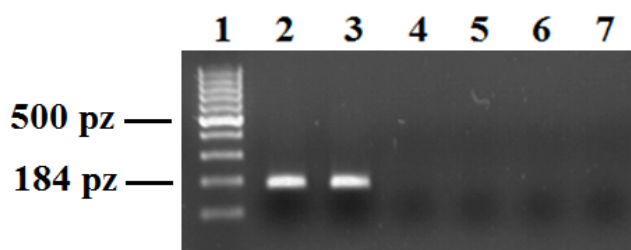
Ryc. 7. Ekspresja białka CTR1 w nerkach myszy 6 miesięcznych. A. Wyniki analizy przeprowadzone z użyciem metody Western blot. Na membranie widoczny jest prążek na wysokości około 70 kDa odpowiadający homotrimerycznej formie białka CTR1. Jako białka referencyjnego użyto aktyny (42 kDa). Do analiz wykorzystano ekstrakty błonowe z nerek pochodzących od czterech osobników z każdej badanej grupy: osobników o genotypie dzikim (+/-(6)), o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ (+/-Cu(6)), mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ (ms/-Cu(6)). B. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji homotrimerycznej formy białka CTR1 u poszczególnych grup badanych myszy: osobników o genotypie dzikim, n=4; o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, n=4; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂, n=4. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD.

7. 5. Analiza poziomu ekspresji genu *Ctr2* w nerkach

Głównym transporterem błonowym umożliwiającym pobieranie jonów miedzi przez komórki jest białko CTR1 (Aller i wsp. 2004, Aller i Unger 2006, De Feo i wsp. 2007, De Feo i wsp. 2009, Petris i wsp. 2003). Tylko niewielka część jonów miedzi jest transportowana do komórek przy udziale białka CTR2. Jak wykazano, tylko 5% białka CTR2 zlokalizowane jest w błonie komórkowej, natomiast pozostałe 95% w obrębie błon lizosomów (Rees i wsp. 2004). Ponadto, białko CTR2 charakteryzuje się dużo mniejszym powinowactwem do jonów miedzi niż białko CTR1 (Bertinato i wsp. 2008). Dlatego też w obecnej pracy skupiono się głównie nad analizą ekspresji genu i białka *Ctr1*/CTR1, natomiast analizę ekspresji *Ctr2* ograniczono do zbadania poziomu transkryptu genu *Ctr2*.

7. 5. 1. Analiza poziomu ekspresji genu *Ctr2* w nerkach – osobniki 14-dniowe

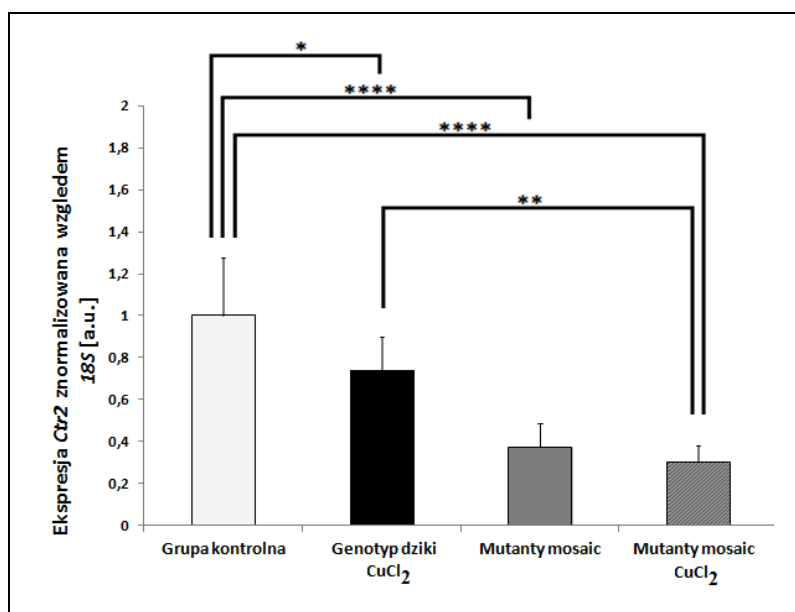
W celu sprawdzenia specyficzności zaprojektowanych starterów dla genu *Ctr2* (Tab. 8.) przeprowadzono reakcję PCR, dzięki której amplifikowano i uwidocznilo na żelu swoisty produkt o wielkości 184 bp (Fot. 17). Produkt ten był widoczny we wszystkich badanych próbkach RT+ zawierających cDNA z nerek osobników o genotypie dzikim – 14-dniowych oraz 6 miesięcznych, co zostało uwidocznione, odpowiednio na ścieżkach 2 i 3. Brak produktu reakcji na ścieżkach 4 i 5 (próby RT-, bez odwrotnej transkryptazy) wskazuje na brak zanieczyszczenia badanych prób genomowym DNA. Brak produktu reakcji na ścieżce 6 (próba zawierająca jako matrycę genomowy DNA) potwierdza, że użyte do reakcji startery były zaprojektowane w odpowiedni sposób. Natomiast brak produktu na ścieżce 7 (próba negatywna), potwierdza brak zanieczyszczenia odczynników i wody używanych do reakcji.



Fot. 17. Wynik reakcji PCR przeprowadzonej dla potwierdzenia specyficzności starterów dla genu *Ctr2*. Na kolejnych ścieżkach: 1 – marker wielkościowy (100 bp), 2 – nerka samca 14-dniowego o genotypie dzikim (RT+); 3 - nerka samca 6 miesięcznego o genotypie dzikim (RT+); 4 – nerka samca 14-dniowego o genotypie dzikim (RT-); 5 - nerka samca 6 miesięcznego o genotypie dzikim (RT-); 6 – próba zawierająca jako matrycę genomowy DNA; 7 – próba negatywna niezawierająca matrycy cDNA.

Badanie poziomu ekspresji genu *Ctr2* przeprowadzono przy użyciu reakcji real time PCR, a otrzymane wyniki analizowano metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Następnie wykonano odpowiednie testy statystyczne pozwalające na wykazanie różnic statystycznie istotnych w poziomie ekspresji genu *Ctr2* pomiędzy badanymi grupami zwierząt.

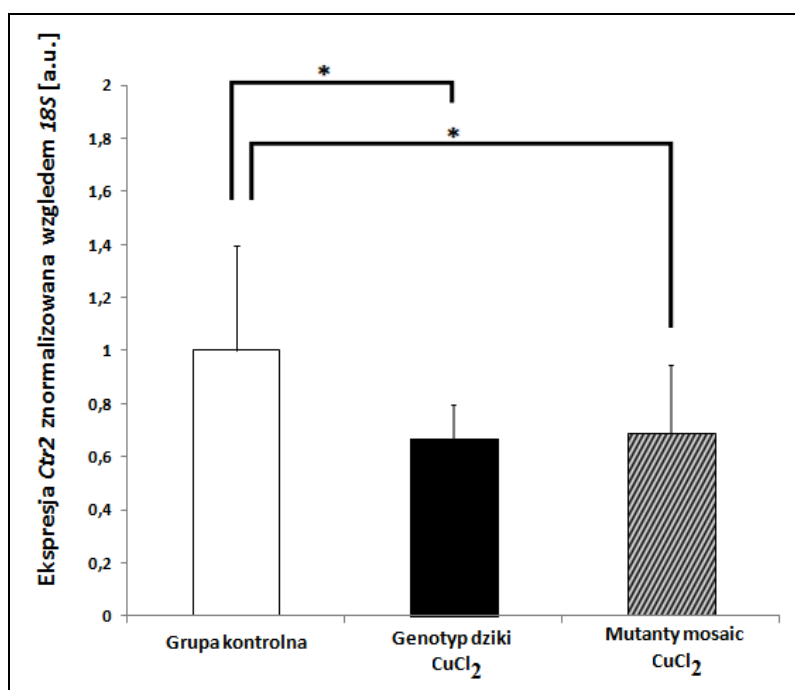
Otrzymane wyniki analizy poziomu ekspresji genu *Ctr2* w nerkach osobników 14-dniowych wykazały, że najwyższy poziom ekspresja tego genu jest obserwowany w nerkach myszy o genotypie dzikim (+/-(14)). Poziom ekspresji badanego genu był u nich statystycznie istotnie wyższy w porównaniu do wszystkich pozostałych badanych grup. Wykazano brak różnic statystycznie istotnych w poziomie ekspresji genu *Ctr2* pomiędzy badanymi grupami mutantów *mosaic* ms/-(14) i ms/-Cu(14). Różnice statystycznie istotne stwierdzono jednak pomiędzy grupami osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ (+/-Cu(14)) oraz grupą mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ (ms/-Cu(14)) (Wyk. 14).



Wyk. 14. Zmiany poziomu ekspresji genu *Ctr2* w nerkach 14-dniowych: samców o genotypie dzikim, n=6; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, n=6; mutantów *mosaic*, n=6; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂, n=6. Poziom ekspresji znormalizowano względem ekspresji genu *18S*. Wyniki przedstawiono jako średnia ±SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice (ANOVA Kruskala-Wallisa) *P<0,05, **P<0,01, ****P<0,0001.

7. 5. 2. Analiza poziomu ekspresji genu *Ctr2* w nerkach – osobniki 46-dniowe

Przeprowadzone wyniki badań nad ekspresją genu *Ctr2* w nerkach myszy pochodzących z trzech grup badanych myszy 46-dniowych wykazały obniżenie ekspresji tego genu zarówno w grupie myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(46)), jak również w grupie myszy mutantów poddanych terapii (ms/-46(Cu)) w stosunku do grupy zwierząt kontrolnych (+/-46)). Nie wykazano natomiast różnic statystycznie istotnych w poziomie ekspresji genu *Ctr2* pomiędzy grupą osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-46(Cu)), a grupą mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (ms/-46(Cu)) (Wyk. 15).

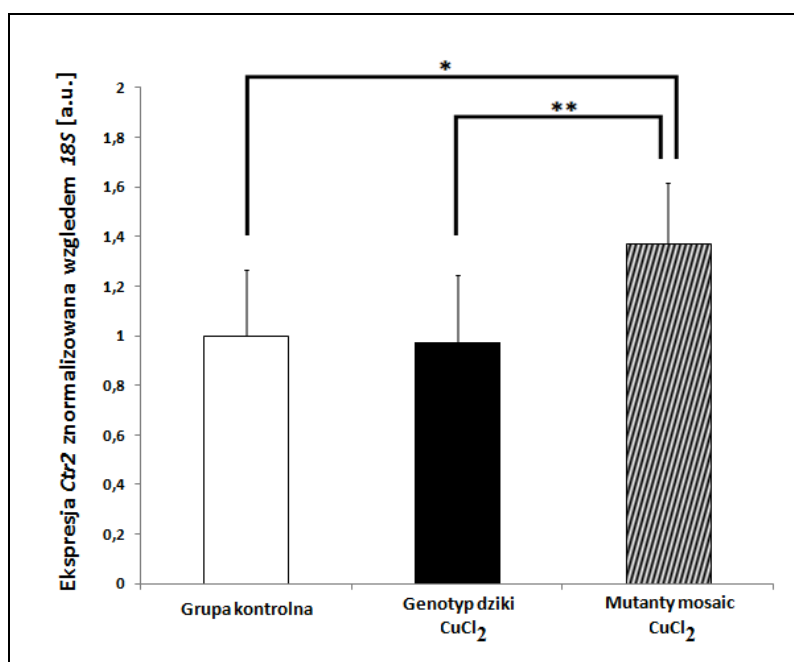


Wyk. 15. Zmiany poziomu ekspresji genu *Ctr2* w nerkach 46-dniowych: samców o genotypie dzikim, n=7; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=7; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=8. Poziom ekspresji znormalizowano względem ekspresji genu *18S*. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice (ANOVA Kruskala-Wallis): *P<0,05.

7. 5. 3. Analiza poziomu ekspresji genu *Ctr2* w nerkach – osobniki 6 miesięczne

W grupie 6 miesięcznych osobników najwyższy poziom ekspresji genu *Ctr2* stwierdzono w nerkach mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II). Poziom ten był istotnie statystycznie wyższy w porównaniach do obu pozostałych grup zwierząt (+/- (6) oraz +/-Cu(6)). Nie stwierdzono natomiast różnic statystycznie istotnych w poziomie

badanego genu pomiędzy grupą samców kontrolnych (+/-(6)), a grupą samców o genotypie dzikim suplementowanych CuCl_2 (+/-Cu(6)) (Wyk. 16).



Wyk. 16. Zmiany poziomu ekspresji genu *Ctr2* w nerkach 6 miesięcznych: samców o genotypie dzikim, n=8; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=8; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=6. Poziom ekspresji znormalizowano względem ekspresji genu *18S*. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice (ANOVA Kruskala-Wallis): * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

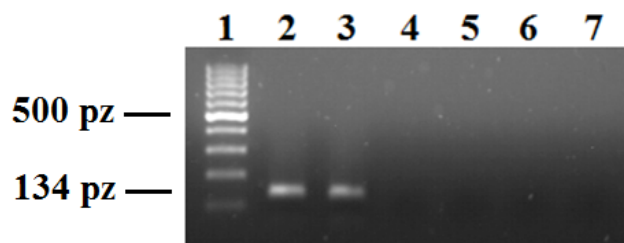
7. 6. Analiza poziomu ekspresji genu oraz białka *Atox1*/ATOX1, a także komórkowej lokalizacji białka ATOX1 w nerkach

Białko ATOX1 jest małym, cytoplazmatycznym transporterem jonów miedzi, którego masa cząsteczkowa wynosi około 7,4 kDa. Białko to należy do grupy metalochaperonów transportujących jony miedzi do białek ATP7A oraz ATP7B, zlokalizowanych w błonach aparatu Golgiego (Hung i wsp. 1998, Lin i wsp. 1997, Prohaska i Gybina 2004). Ekspresja genu *ATOX1*/*Atox1* występuje w wielu tkankach i organach, co zostało stwierdzone zarówno u człowieka, jak i u myszy. Szczególnie wysoką ekspresję tego białka odnotowano w nerkach oraz wątrobie (Hamza i wsp. 2000). Białko ATOX1 jest nie tylko metalochaperonem, ale po związaniu z jonami miedzi, może być transportowane do jądra komórkowego, gdzie pełni rolę czynnika transkrypcyjnego regulującego ekspresję genów, takich jak *Ccnd1* oraz *Sod3* (Itoh i wsp. 2008, Itoh i wsp. 2009, Jeney i wsp. 2005, Qin i wsp. 2006). W obecnej pracy zbadano

poziom ekspresji genu *Atox1* w nerkach u wszystkich badanych grup wiekowych myszy. Ponadto, aby sprawdzić czy wysoki poziom miedzi w nerkach prowadzi do przemieszczenia białka ATOX1 w do jądra komórkowego, wykorzystując metodę immunofluorescencyjną, zbadano lokalizację białka ATOX1 w komórkach nerek u wszystkich badanych grup wiekowych myszy.

7. 6. 1. Analiza poziomu ekspresji genu *Atox1* w nerkach – osobniki 14-dniowe

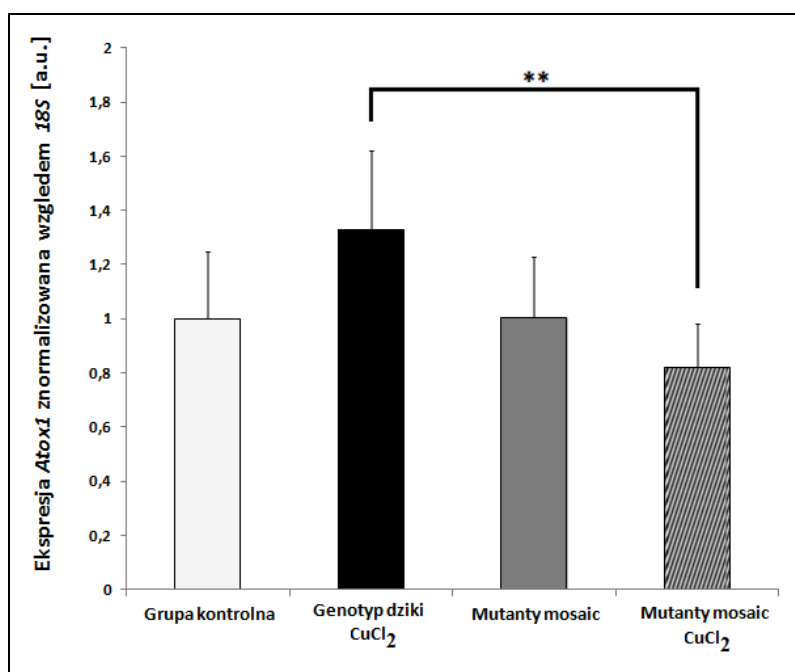
W celu sprawdzenia specyficzności zaprojektowanych starterów dla genu *Atox1* (Tab. 8.) przeprowadzono reakcję PCR, dzięki której amplifikowano i uwidoczniono na żelu swoisty produkt o wielkości 134 bp (Fot. 18). Produkt ten był widoczny we wszystkich badanych próbkach RT+ zawierających cDNA z nerek osobników o genotypie dzikim – 14-dniowych oraz 6 miesięcznych, co zostało uwidocznione, odpowiednio na ścieżkach 2 i 3. Brak produktu reakcji na ścieżkach 4 i 5 (próby RT-, bez odwrotnej transkryptazy) wskazuje na brak zanieczyszczenia badanych prób genomowym DNA. Brak produktu reakcji na ścieżce 6 (próba zawierająca jako matrycę genomowy DNA) potwierdza, że użyte do reakcji startery były zaprojektowane w odpowiedni sposób. Natomiast brak produktu na ścieżce 7 (próba negatywna), potwierdza brak zanieczyszczenia odczynników i wody używanych do reakcji.



Fot. 18. Wynik reakcji PCR przeprowadzonej dla potwierdzenia specyficzności starterów dla genu *Atox1*. Na kolejnych ścieżkach: 1 – marker wielkościowy (100 bp), 2 – nerka samca 14-dniowego o genotypie dzikim (RT+); 3 - nerka samca 6 miesięcznego o genotypie dzikim (RT+); 4 – nerka samca 14-dniowego o genotypie dzikim (RT-); 5 - nerka samca 6 miesięcznego o genotypie dzikim (RT-); 6 – próba zawierająca jako matrycę genomowy DNA; 7 – próba negatywna niezawierająca matrycy cDNA.

W celu określenia poziomu ekspresji genu *Atox1* u myszy 14-dniowych przeprowadzono reakcję real time PCR, a następnie analizowano otrzymane wyniki

wykorzystując metodę $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Porównanie poziomu ekspresji genu *Atox1* pomiędzy czterema grupami osobników 14-dniowych wykazało, że statystycznie istotne różnice występowały tylko pomiędzy grupami, które traktowane były związkami miedzi – grupą samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(14)) oraz grupą mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (ms/-Cu(14)) (Wyk. 17). Ekspresja ta była znacznie wyższa u myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 niż u mutantów *mosaic* poddanych terapii. Nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w poziomie ekspresji genu *Atox1* pomiędzy grupą kontrolną (+/-14), a grupami mutantów ms/-(14) oraz ms/-Cu(14). Podobnie nie stwierdzono różnic w poziomie ekspresji badanego genu *Atox1* pomiędzy grupą kontrolną, a grupą samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (Wyk. 17).



Wyk. 17. Zmiany poziomu ekspresji genu *Atox1* w nerkach 14-dniowych: samców o genotypie dzikim, n=9; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=6; mutantów *mosaic*, n=7; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=7. Poziom ekspresji znormalizowano względem ekspresji genu *18S*. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice (ANOVA dwuczynnikowa): **P<0,01.

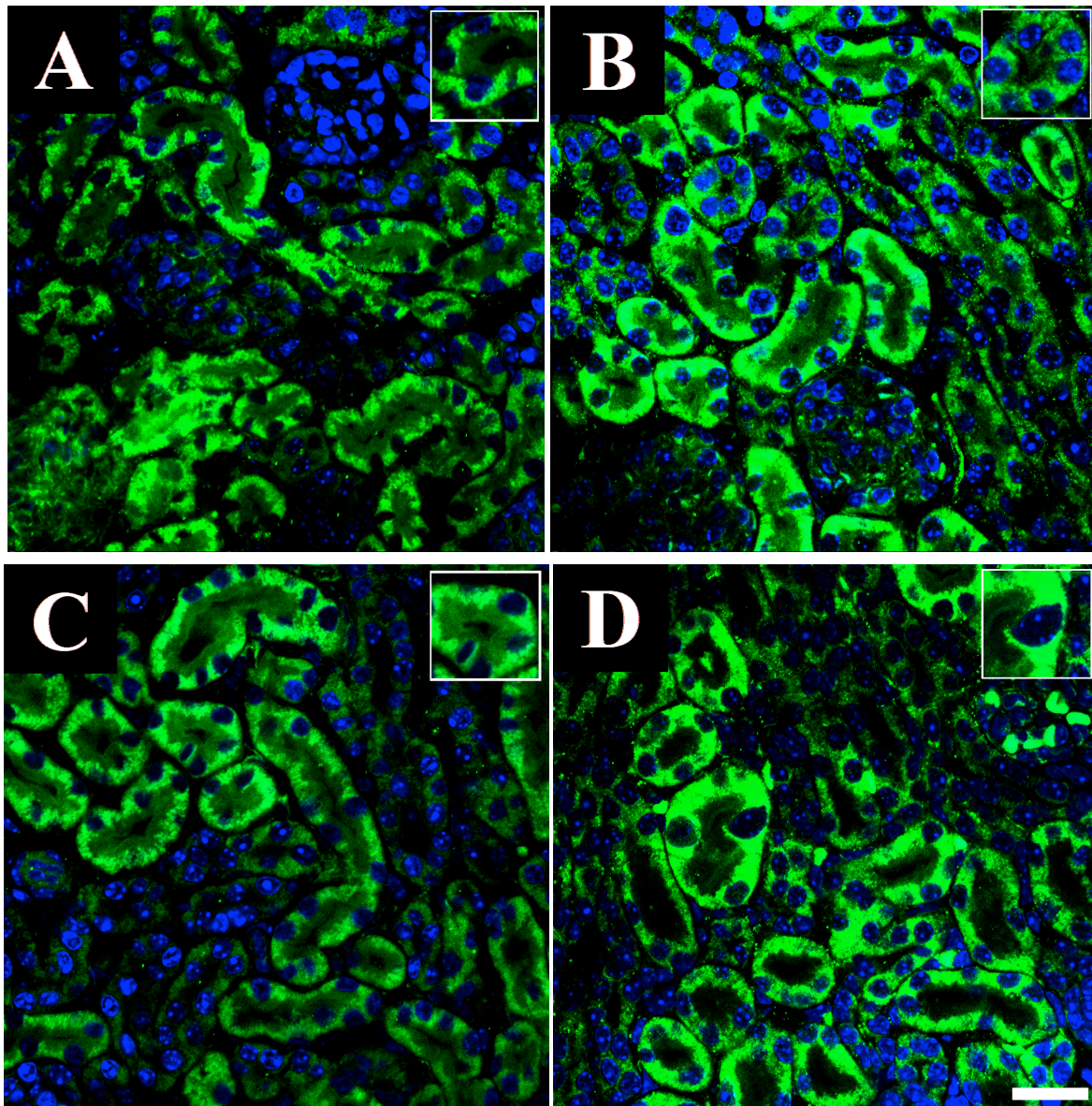
7. 6. 2. Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka ATOX1 w obrębie kory nerki – osobniki 14-dniowe

W celu określenia wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka ATOX1 wykonano serię reakcji immunofluorescencyjnych na skrawkach mrożeniowych z nerek, które pochodziły od

wszystkich analizowanych grup osobników 14-dniowych. Do reakcji wykorzystano odpowiednie przeciwciała poliklonalne wyprodukowane w kozie, które wiąże się do białka ATOX1 (Tab. 13). Jako przeciwciała drugorzędowego użyto wyprodukowane w ośle, anty-kozie przeciwciała sprzężone z fluorochromem Alexa Fluor 488 (Tab. 14). Jądra komórkowe zostały uwidocznione za pomocą DAPI zawartego w medium Vectashield (Tab. 1). Przeprowadzone w ramach obecnej pracy analizy wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka ATOX1 w nerkach badanych grup zwierząt wykazały, że ekspresja badanego białka zachodzi w obrębie kory nerki, natomiast nie wykazano ekspresji białka ATOX1 w obrębie rdzenia nerki. Dlatego też przedstawione w obecnej pracy wyniki komórkowej lokalizacji białka ATOX1 obejmują analizy w obrębie kory nerek myszy wszystkich badanych grup wiekowych.

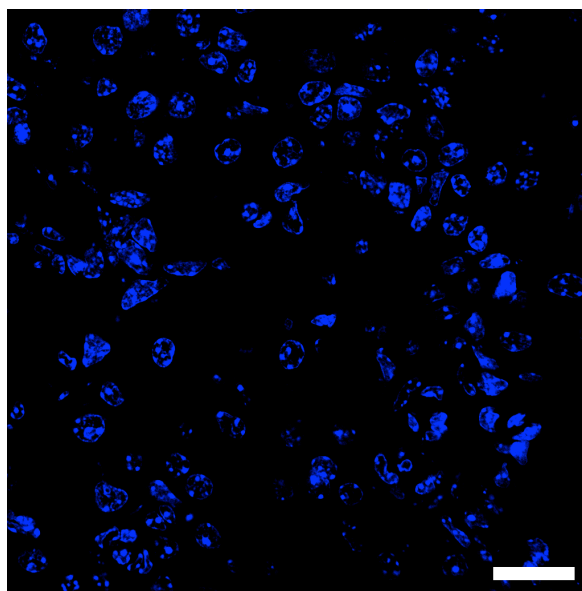
Przeprowadzone reakcje immunofluorescencyjne wykazały, że w obrębie kory nerki u wszystkich badanych grup zwierząt 14-dniowych białko ATOX1 wykazuje ekspresję w komórkach kanalików nerkowych. Badane białko zlokalizowane było w cytoplazmie komórek nabłonkowych kanalików nerkowych. Nie obserwowano lokalizacji tego białka w jądrach komórkowych.

Analizy wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników 14-dniowych o genotypie dzikim (+/-14), będących grupą kontrolną pokazano na fotografii 19A (Fot. 19A). Badane białko wykazuje ekspresję tylko w obrębie cytoplazmy komórek nabłonkowych kanalików nerkowych. Przeprowadzone analizy nie wykazały, aby białko ATOX1 przyjmowało lokalizację jądrową. Podobne wyniki uzyskano analizując ekspresję białka ATOX1 na skrawkach nerek pochodzących od 14-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(14)) (Fot. 19B). U obu grup 14-dniowych mutantów *mosaic* ms/-(14) oraz ms/-Cu(14) białko ATOX1 zlokalizowane jest również w obrębie cytoplazmy komórek nabłonkowych kanalików nerkowych. U żadnej z badanych grup nie zaobserwowano lokalizacji tego białka w obrębie jądra komórkowego (Fot. 19C., Fot. 19D).



Fot. 19. Ekspresja białka ATOX1 w korze nerki samców 14-dniowych. A. Samiec kontrolny, ekspresja białka ATOX1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w cytoplazmie, brak lokalizacji badanego białka w jądrach komórkowych (insert). B. Samiec o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 , ekspresja białka ATOX1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w cytoplazmie, brak lokalizacji badanego białka w jądrach komórkowych (insert). C. Samiec mutant *mosaic*, ekspresja białka ATOX1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w cytoplazmie, brak lokalizacji badanego białka w jądrach komórkowych (insert). D. Samiec mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 , ekspresja białka ATOX1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w cytoplazmie, brak lokalizacji badanego białka w jądrach komórkowych (insert); analizę przeprowadzono u: n=5 osobników o genotypie dzikim; n=4 osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ; n=5 mutantów *mosaic*; n=4 mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ; białko CTR1 znakowane fluorochromem Cy3 (czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski); skala bar = 20 μm .

W celu potwierdzenia, że używane do reakcji immunofluorescencji przeciwciała pierwszorzędowe, wiążące się do białka ATOX1, wiążą się specyficznym z odpowiednim przeciwciałem drugorzędowym wykonano reakcję, w której zamiast przeciwciała pierwszorzędowego na skrawki nałożono roztwór 3% BSA w PBS. Skrawki takie inkubowano całą noc w temperaturze pokojowej w komorze mokrej, a następnie płukano i nakładano przeciwciała drugorzędowe. Preparaty następnie płukano, tak jak opisano w podrozdziale 7. 3. 4. 2, a następnie zamykano używając medium (Vectashield) zawierające DAPI. Na preparatach takich nie obserwowano sygnału immunopozytywnego, co wskazuje, że przeciwciała drugorzędowe łączy się specyficznym z użytym przeciwciałem pierwszorzędowym. W przypadku braku przeciwciała pierwszorzędowego niezwiązane przeciwciała drugorzędowe zostaje odpłukane.



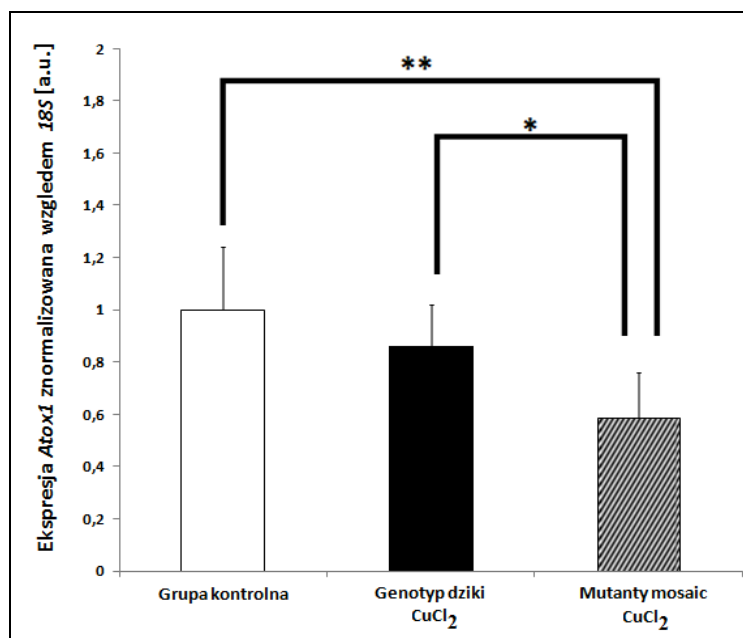
Fot. 20. Nerka osobnika 14-dniowego o genotypie dzikim – próba negatywna; brak sygnału pochodzącego od fluorochromu Alexa Fluor488, jądra komórkowe wybarwione DAPI; skala bar = 20 μm .

7. 6. 3. Analiza poziomu ekspresji genu *Atox1* w nerkach – osobniki 46-dniowe

Przeprowadzono również analizę ekspresji genu oraz białka *Atox1*/ATOX1 w nerkach myszy 46-dniowych, aby sprawdzić, czy długotrwałe podawanie chlorku miedzi (II) ma wpływ na ekspresję badanego genu.

Wykorzystując reakcję real time PCR, przeprowadzono analizę poziomu ekspresji genu *Atox1* w nerkach u wszystkich badanych grup zwierząt 46-dniowych. Otrzymane wyniki

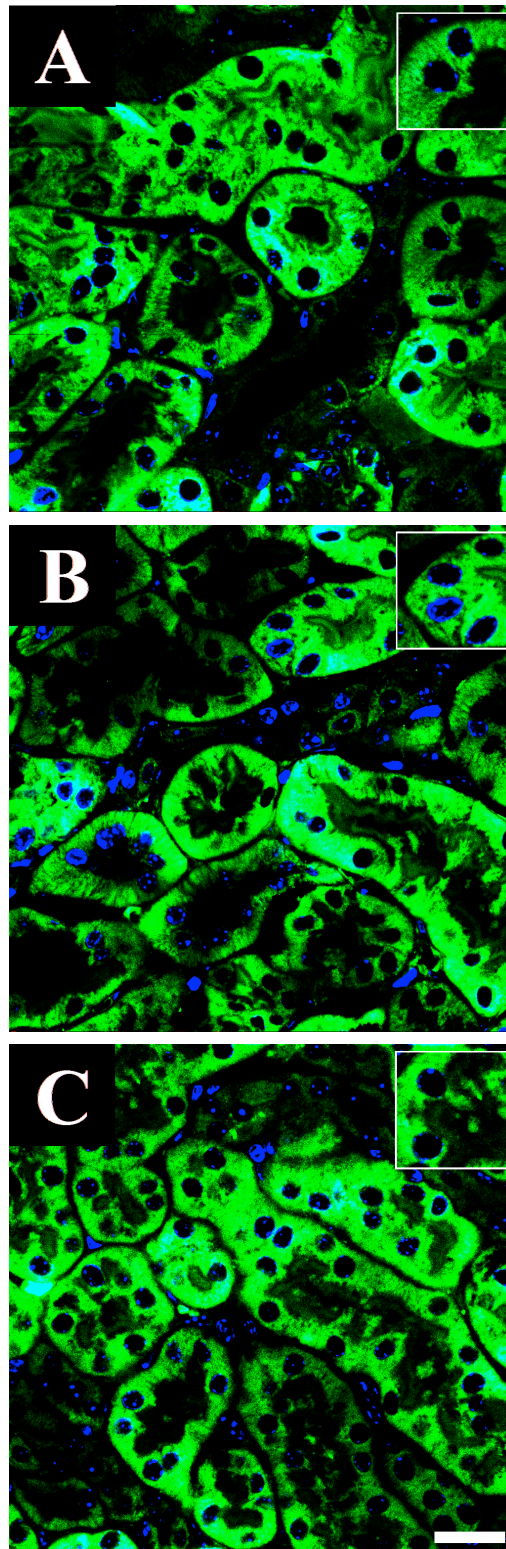
wskazują, że poziom ekspresji genu *Atox1* jest znacznie niższy u mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) zarówno w porównaniu do osobników grupy kontrolnej (+/-(46)), jak i w porównaniu do osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(46))(Wyk. 18).



Wyk. 18. Zmiany poziomu ekspresji genu *Atox1* w nerkach 46-dniowych: samców o genotypie dzikim, n=6; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=8; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=6. Poziom ekspresji znormalizowano względem ekspresji genu *18S*. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice (ANOVA dwuczynnikowa): * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

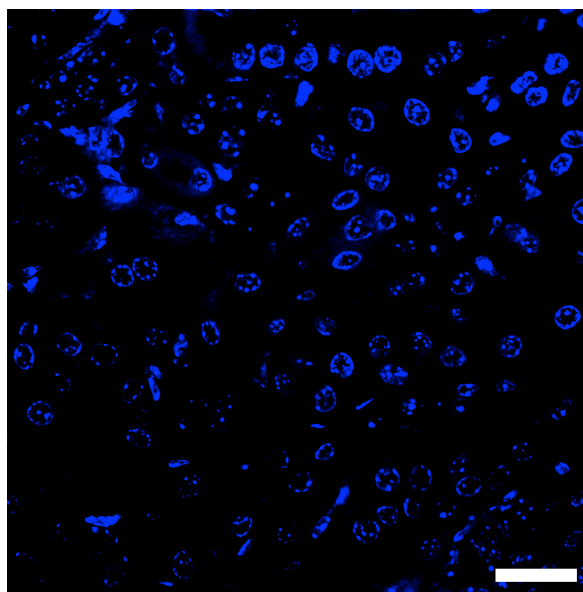
7. 6. 4. Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka ATOX1 w obrębie kory nerki – osobniki 46-dniowe

Przeprowadzona analiza immunofluorescencyjna pozwoliła wykazać, że białko ATOX1 zlokalizowane jest w obrębie cytoplazmy komórek nabłonkowych kanalików nerkowych u wszystkich badanych grup myszy 46-dniowych. Nie stwierdzono lokalizacji białka ATOX1 w jądrze komórkowym u żadnej z badanych grup 46-dniowych myszy. Wyniki reakcji immunofluorescencyjnej przeprowadzonej na skrawkach nerek pochodzących od myszy kontrolnych przedstawiono na fotografii 21A (Fot. 21A). U osobników 46-dniowych o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 lokalizacja białka ATOX1 była bardzo podobna jak u osobników kontrolnych (Fot. 21B). Analiza immunofluorescencyjna przeprowadzona na nerkach pochodzących od 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 również wykazała, że białko ATOX1 występuje w cytoplazmie i nie przyjmuje lokalizacji jądrowej w komórkach nabłonkowych kanalików nerkowych (Fot. 21C).



Fot. 21. Ekspresja białka ATOX1 w korze nerki samców 46-dniowych. A. Samiec kontrolny, ekspresja białka ATOX1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w cytoplazmie, brak lokalizacji badanego białka w jądrach komórkowych (insert). B. Samiec o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 , ekspresja białka ATOX1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w cytoplazmie, brak lokalizacji badanego białka w jądrach komórkowych (insert). C. Samiec mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 , ekspresja białka ATOX1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w cytoplazmie, brak lokalizacji badanego białka w jądrach komórkowych (insert); analizę przeprowadzono u: $n=4$ osobników o genotypie dzikim; $n=4$ osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ; $n=5$ mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ; białko CTR1 znakowane fluorochromem Cy3 (czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski); skala bar = 20 μm .

W celu potwierdzenia specyficzności wiązania użytego w reakcji immunofluorescencji przeciwciała pierwszorzędowego z przeciwciałem drugorzędowym wykonano reakcję tak jak to opisano w podrozdziale 8. 6. 2. Na tak przygotowanych preparatach nie obserwowano sygnału immunopozytywnego, co wskazuje na specyficzne wiązanie pomiędzy przeciwciałem pierwszorzędowym oraz drugorzędowym (Fot. 22).

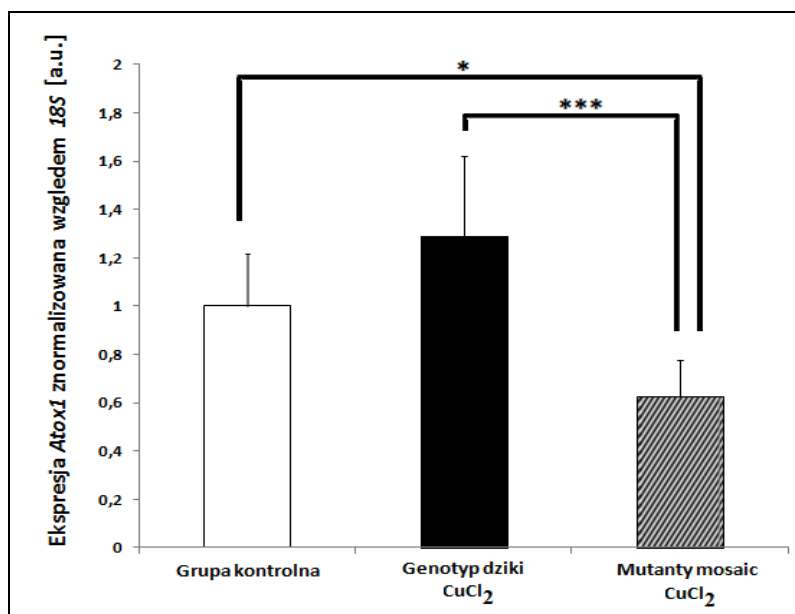


Fot. 22. Nerka osobnika 46-dniowego o genotypie dzikim – próba negatywna; brak sygnału pochodzącego od fluorochromu Alexa Fluor488, jądra komórkowe wybarwione DAPI; skala bar = 20 μ m.

7. 6. 5. Analiza poziomu ekspresji genu *Atox1* w nerkach – osobniki 6 miesięczne

Wykorzystanie do analiz nerek pochodzących od myszy 6 miesięcznych o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic*, które w ciągu pierwszych 44 dni życia otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II), miało na celu sprawdzenie długotrwałego efektu suplementacji CuCl_2 na ekspresję genu *Atox1*.

Analiza zmian poziomu ekspresji genu *Atox1* w nerkach osobników 6 miesięcznych wykazała, że nie istnieją statystycznie istotne różnice w ekspresji badanego genu pomiędzy osobnikami grupy kontrolnej (+/-(6)), a osobnikami o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(6)). Stwierdzono natomiast obniżenie ekspresji tego genu u myszy mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) zarówno w stosunku do osobników pochodzących z grupy kontrolnej, jak i w stosunku do osobników myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (Wyk. 19).

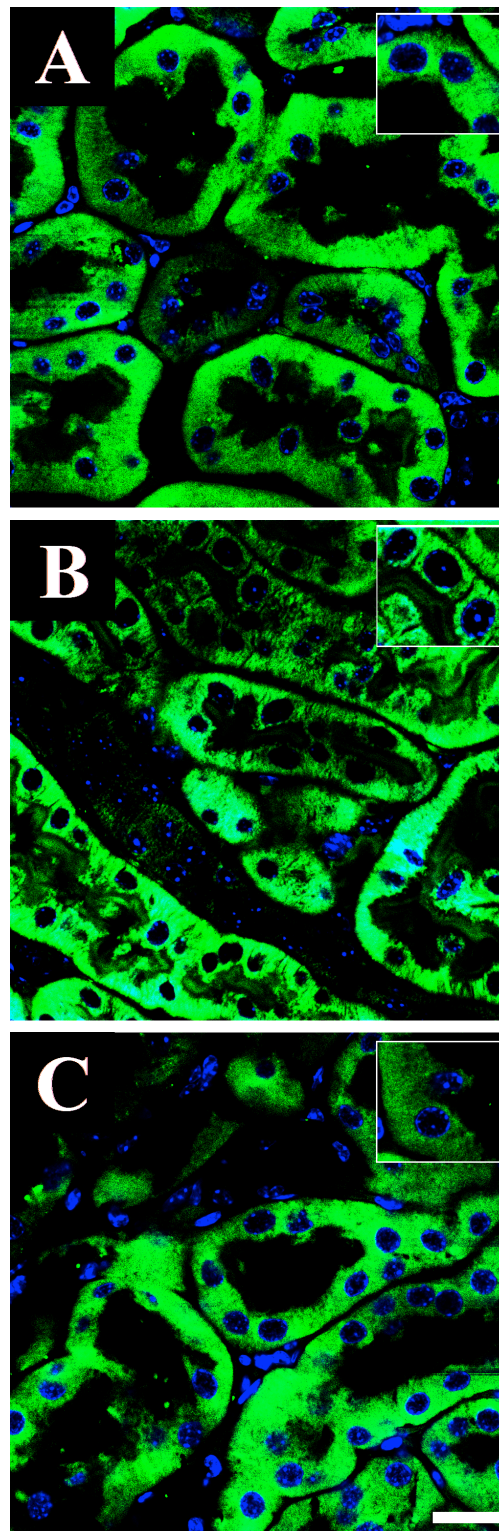


Wyk. 19. Zmiany poziomu ekspresji genu *Atox1* w nerkach 6 miesięcznych: samców o genotypie dzikim, n=6; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, n=8; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂, n=6. Poziom ekspresji znormalizowano względem ekspresji genu *18S*. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice (ANOVA dwuczynnikowa): *P<0,05, ***P<0,001.

7. 6. 6. Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka ATOX1 w obrębie kory nerki – osobniki 6 miesięczne

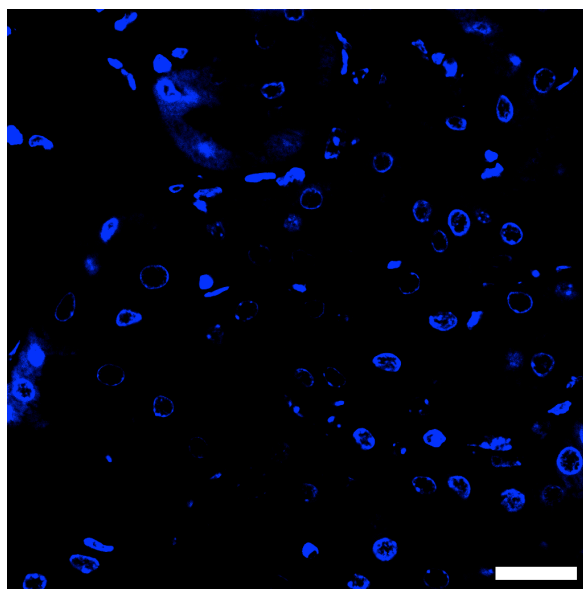
W obrębie kory nerki u wszystkich badanych grup zwierząt 6 miesięcznych białko ATOX1 wykazuje ekspresję w komórkach kanalików nerkowych, gdzie zlokalizowane jest w obrębie cytoplazmy.

Wyniki reakcji immunofluorescencyjnej wykonanej na skrawkach nerek pochodzących od 6 miesięcznych osobników o genotypie dzikim (+/-(6)) wykazały, że białko ATOX1 zlokalizowane jest w cytoplazmie komórek nabłonkowych kanalików nerkowych, natomiast nie wykazano lokalizacji badanego białka w jądrze komórkowym (Fot. 23A). Podobną lokalizację białka ATOX1, jak w przypadku osobników kontrolnych (+/-(6)), obserwowano na preparatach z nerek pochodzących od 6 miesięcznych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ (+/-Cu(6)) (Fot. 23B). Również u 6 miesięcznych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ (ms/-Cu(6)) wykazano, że białko ATOX1 zlokalizowane jest w obrębie cytoplazmy komórek nabłonkowych kanalików nerkowych. Podobnie jak u osobników kontrolnych, również u mutantów ms/-Cu(6) nie stwierdzono lokalizacji badanego białka w jądrach komórkowych (Fot. 23C).



Fot. 23. Ekspresja białka ATOX1 w korze nerki samców 6 miesięcznych. A. Samiec kontrolny, ekspresja białka ATOX1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w cytoplazmie, brak lokalizacji badanego białka w jądrach komórkowych (insert). B. Samiec o genotypie dzikim poddany suplementacji CuCl_2 , ekspresja białka ATOX1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w cytoplazmie, brak lokalizacji badanego białka w jądrach komórkowych (insert). C. Samiec mutant *mosaic* poddany terapii CuCl_2 , ekspresja białka ATOX1 widoczna w komórkach kanalików nerkowych w cytoplazmie, brak lokalizacji badanego białka w jądrach komórkowych (insert); analizę przeprowadzono u: n=4 osobników o genotypie dzikim; n=4 osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 ; n=4 mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ; białko CTR1 znakowane fluorochromem Cy3 (czerwony), jądra komórkowe wybarwione DAPI (niebieski); skala bar = 20 μm .

W celu potwierdzenia specyficzności wiązania użytego w reakcji immunofluorescencji przeciwciała pierwszorzędowego z przeciwciałem drugorzędowym wykonano reakcję tak jak to opisano w podrozdziale 8. 6. 2. Na tak przygotowanych preparatach nie obserwowano sygnału immunopozytywnego, co wskazuje na specyficzne wiązanie pomiędzy przeciwciałem pierwszorzędowym oraz drugorzędowym (Fot. 24).



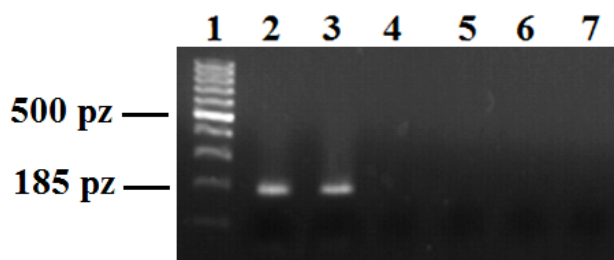
Fot. 24. Nerka osobnika 6 miesięcznego o genotypie dzikim – próba negatywna; brak sygnału pochodzącego od fluorochromu Alexa Fluor488, jądra komórkowe wybarwione DAPI; skala bar = 20 μ m.

7. 7. Analiza poziomu ekspresji genu oraz białka *Ccs/CCS* w nerkach

Białko CCS jest cytoplazmatycznym transporterem jonów miedzi, które należy do grupy metalochaperonów (Bartnikas i wsp. 2000, Palumaa 2013, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004, Wong i wsp. 2000). Jest ono odpowiedzialne za transport jonów miedzi do enzymu dysmutazy ponadtlenkowej SOD1, katalizującego reakcję dysmutacji anionorodnika nadtlenkowego do tlenku oraz nadtlenku wodoru, a tym samym biorącego udział w usuwaniu wolnych rodników (Bartosz 2006, Bartosz 2009, Casareno i wsp. 1998, Culotta i wsp. 1997, Rae i wsp. 1999, Tirzitis i Bartosz 2010). Wysoką ekspresję genu *Ccs* stwierdzono przede wszystkim w wątrobie, nerkach, nadnerczach, płucach czy sercu (Rothstein i wsp. 1999). W obecnej pracy podjęto próbę sprawdzenia czy zmiany zawartości miedzi w nerkach wpływają na poziom ekspresji genu oraz białka *Ccs/CCS*.

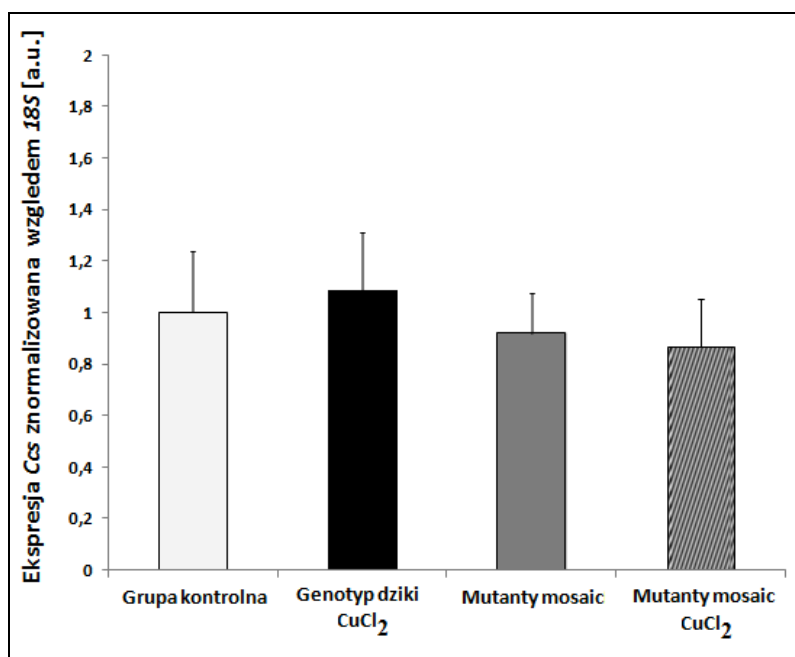
7. 7. 1. Analiza poziomu ekspresji genu *Ccs* w nerkach – osobniki 14-dniowe

W celu sprawdzenia specyficzności zaprojektowanych starterów dla genu *Ccs* (Tab. 8.) przeprowadzono reakcję PCR, dzięki której amplifikowano i uwidoczniło na żelu swoisty produkt o wielkości 185 bp (Fot. 25). Produkt ten był widoczny we wszystkich badanych próbkach RT+ zawierających cDNA z nerek osobników o genotypie dzikim – 14-dniowych oraz 6 miesięcznych, co zostało uwidocznione, odpowiednio na ścieżkach 2 i 3. Brak produktu reakcji na ścieżkach 4 i 5 (próby RT-, bez odwrotnej transkryptazy) wskazuje na brak zanieczyszczenia badanych prób genomowym DNA. Brak produktu reakcji na ścieżce 6 (próba zawierająca jako matrycę genomowy DNA) potwierdza, że użyte do reakcji startery były zaprojektowane w odpowiedni sposób. Natomiast brak produktu na ścieżce 7 (próba negatywna), potwierdza brak zanieczyszczenia odczynników i wody używanych do reakcji.



Fot. 25. Wynik reakcji PCR przeprowadzonej dla potwierdzenia specyficzności starterów dla genu *Ccs*. Na kolejnych ścieżkach: 1 – marker wielkościowy (100 bp), 2 – nerka samca 14-dniowego o genotypie dzikim (RT+); 3 - nerka samca 6 miesięcznego o genotypie dzikim (RT+); 4 – nerka samca 14-dniowego o genotypie dzikim (RT-); 5 - nerka samca 6 miesięcznego o genotypie dzikim (RT-); 6 – próba zawierająca jako matrycę genomowy DNA; 7 – próba negatywna niezawierająca matrycy cDNA.

Przeprowadzono analizy poziomu ekspresji genu *Ccs* w nerkach wykorzystując metodę real time PCR. Wyniki otrzymanych reakcji analizowano używając metody $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Otrzymane wyniki wskazują, że nie ma statystycznie istotnej różnicy w poziomie ekspresji genu *Ccs* pomiędzy badanymi grupami myszy 14-dniowych (Wyk. 20). Otrzymane wyniki wskazują również, że podawanie chlorku miedzi (II) nie wpływa na zmiany ekspresji tego genu w nerkach osobników 14-dniowych.



Wyk. 20. Zmiany poziomu ekspresji genu *Ccs* w nerkach 14-dniowych: samców o genotypie dzikim, n=6; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, n=7; mutantów *mosaic*, n=6; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂, n=7. Poziom ekspresji znormalizowano względem ekspresji genu *18S*. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD.

7. 7. 2. Analiza poziomu ekspresji białka CCS w nerkach – osobniki 14-dniowe

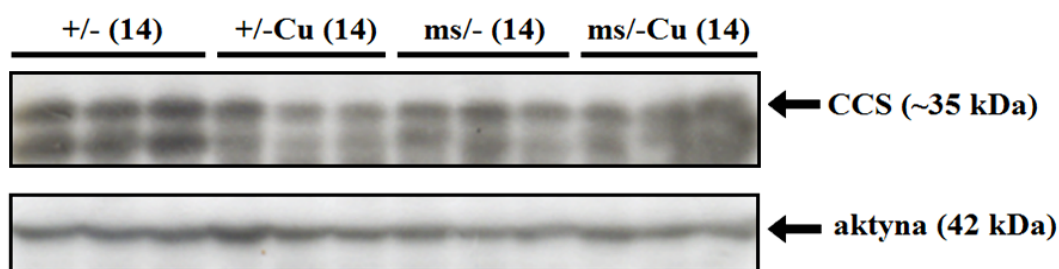
Białko CCS w swojej dojrzałej formie jest najbardziej złożoną cząsteczką spośród poznanych dotychczas metalochaperonów. CCS jest dużym białkiem o masie cząsteczkowej wynoszącej około 35 kDa, zbudowane jest ono z trzech zróżnicowanych funkcjonalnie domen, co umożliwia mu związanie jonów miedzi, ich transport w obrębie cytoplazmy oraz wbudowanie do formy apo białka dysmutazy ponadtlenkowej (SOD1) (Bartnikas i wsp. 2000, Furukawa i O'Halloran 2006, Leitch i wsp. 2009b, Prohaska i wsp. 2003a, Schmidt i wsp. 1999, West i Prohaska 2004, Wong i wsp. 2000). Wyniki dotychczasowych badań nad ekspresją białka CCS wykazały, że poziom tego białka zależy od stężenia jonów miedzi (Bertinato i L'Abbé 2003, Bertinato i wsp. 2010). Ponieważ zawartość miedzi w nerkach obu grup mutantów *ms*^{-/-}(14) oraz *ms*^{-/-}-Cu(14) jest znacznie wyższa niż u osobników o genotypie dzikim *+/-(14)* oraz *+/-(14)*-Cu(14) postanowiono sprawdzić, czy poziom ekspresji badanego białka w nerkach również ulega zmianie.

Przy użyciu metody Western blot wykonano analizy, które pozwoliły na ilościowe porównanie poziomu ekspresji białka CCS w nerkach wszystkich badanych grup zwierząt 14-dniowych. W tym celu przygotowano ekstrakty białkowe z nerek, które następnie podzielono

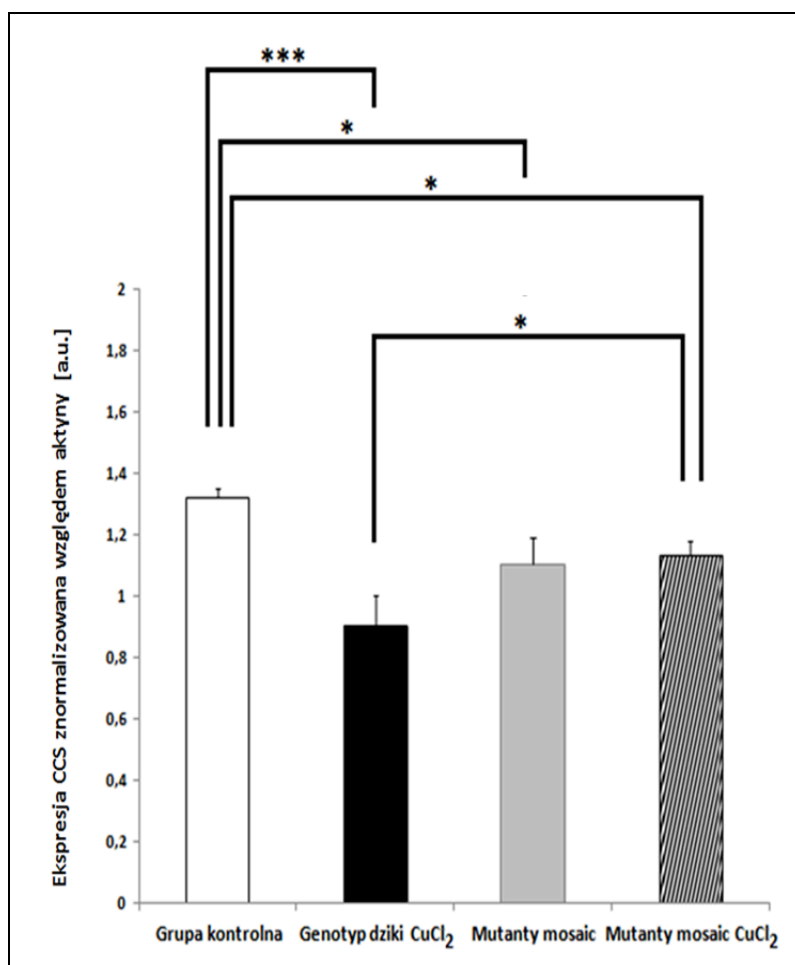
na frakcję błonową oraz cytoplazmatyczną. Do analiz ekspresji białka CCS użyto frakcji cytoplazmatycznej. Badane próbki poddane zostały procesowi denaturacji cieplnej. Ilościowej analizie poddano prążek odpowiadający masie 35 kDa, który odpowiadał frakcji badanego białka CCS. Za pomocą programu komputerowego (Quantity One, BioRad) wykonano analizy densytometryczne, dzięki którym określono zmiany poziomu ekspresji białka CCS. Jako białko referencyjne użyto aktyny o masie cząsteczkowej 42 kDa.

Analizę ekspresji białka CCS w nerkach przeprowadzono dla wszystkich grup osobników 14-dniowych. Otrzymane wyniki pokazały, że badane białko wykazuje ekspresję w nerkach u wszystkich badanych grup myszy (Ryc. 8A). Przeprowadzone analizy densytometryczne wykazały że najwyższa ekspresja białka CCS występuje u osobników kontrolnych (+/-14). Wyraźny spadek ekspresji białka CCS występuje w przypadku osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 w porównaniu do osobników kontrolnych. Ponadto spadek ekspresji badanego białka w porównaniu do osobników kontrolnych wykazują zarówno mutanty *mosaic* niepoddane terapii $\text{ms}/-(14)$, jak i poddane iniekcji CuCl_2 $\text{ms}/-\text{Cu}(14)$. Przeprowadzone analizy statystyczne nie wykazały natomiast różnic w poziomie ekspresji białka CCS pomiędzy grupą mutantów *mosaic* traktowanych oraz nietraktowanych roztworem chlorku miedzi (II). Natomiast porównanie poziomu ekspresji obu grup suplementowanych CuCl_2 pokazało, że poziom białka CCS był wyższy u mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 ($\text{ms}/-\text{Cu}(14)$) w porównaniu do grupy osobników o genotypie dzikim, które również otrzymywały suplementację chlorkiem miedzi (II) (Ryc.8B).

A.



B.

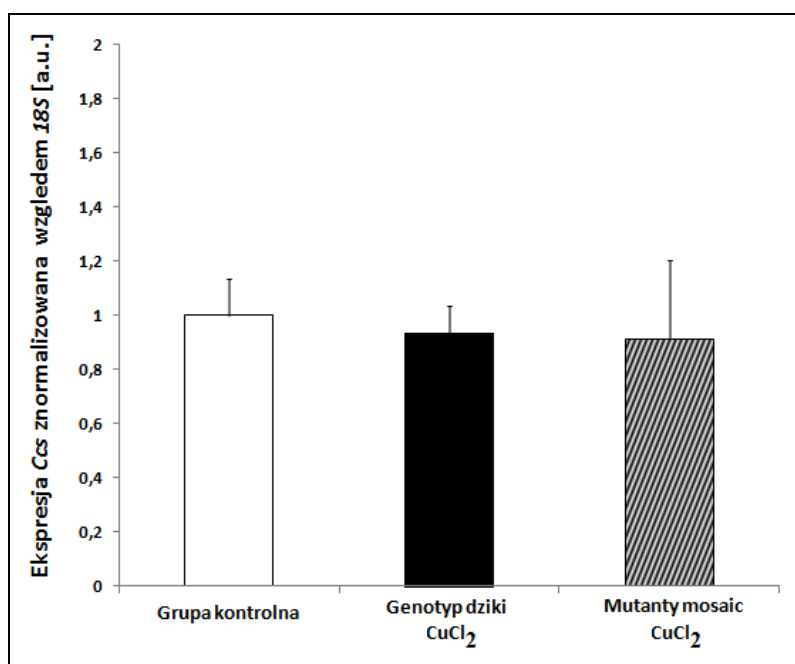


Ryc. 8. Ekspresja białka CCS w nerkach myszy 14-dniowych. A. Wyniki analizy przeprowadzone z użyciem metody Western blot. Na membranie widoczny jest prążek na wysokości około 35 kDa odpowiadający białku CCS. Jako białka referencyjnego użyto aktyny (42 kDa). Do analiz wykorzystano ekstrakty cytoplazmatyczne z nerek pochodzących od trzech osobników z każdej badanej grupy: osobników o genotypie dzikim (+/- (14)), o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ (+/-Cu (14)), mutantów *mosaic* (ms/- (14)), mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ (ms/-Cu (14)). B. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białka CCS u poszczególnych grup badanych myszy: osobników o genotypie dzikim, n=3; o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, n=3; mutantów *mosaic*, n=3; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂, n=3. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice: *P<0,05; ***P<0,001.

7. 7. 3. Analiza poziomu ekspresji genu *Ccs* w nerkach – osobniki 46-dniowe

Poziom ekspresji genu *Ccs* zbadano również w nerkach osobników 46-dniowych, co miało na celu sprawdzenie, czy długotrwałe podawanie chlorku miedzi (II) ma wpływ na ekspresję badanego genu.

Wyniki reakcji real time PCR wykazały, że podobnie, jak w przypadku osobników 14-dniowych, również u myszy 46-dniowych nie znaleziono istotnie statystycznych różnic w poziomie ekspresji genu *Ccs* w nerkach (Wyk. 21).



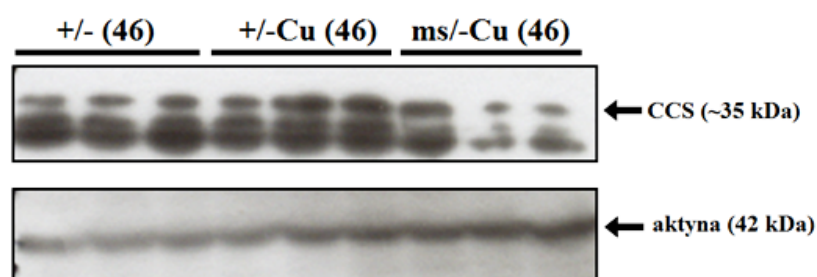
Wyk. 21. Zmiany poziomu ekspresji genu *Ccs* w nerkach 46-dniowych: samców o genotypie dzikim, n=6; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, n=6; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂, n=6. Poziom ekspresji znormalizowano względem ekspresji genu *18S*. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD.

7. 7. 4. Analiza poziomu ekspresji białka CCS w nerkach – osobniki 46-dniowe

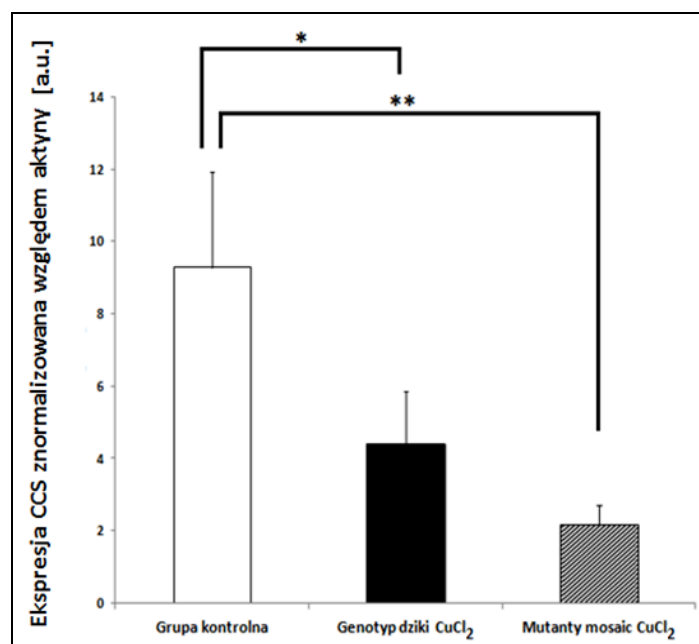
W celu przeprowadzenia ilościowych analiz poziomu ekspresji białka CCS w nerkach osobników 46-dniowych wykorzystano metodę Western blot. Analizie poddano, podobnie jak w przypadku osobników 14-dniowych, prążki o wielkości około 35 kDa, które odpowiadały frakcji białka CCS. Za pomocą programu komputerowego (Quantity One, BioRad) wykonano analizy densytometryczne, dzięki którym określono zmiany poziomu ekspresji białka CCS. Jako białka referencyjnego użyto aktyny o masie cząsteczkowej 42 kDa.

Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały ekspresję białka CCS w nerkach u wszystkich grup badanych myszy 46-dniowych (Ryc. 9A). Przeprowadzone analizy densytometryczne wykazały, że ekspresja białka CCS wyraźnie spada zarówno w grupie osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(46)), jak i w grupie mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) (ms/-Cu(46)) w porównaniu do grupy kontrolnej (+/-(46)). Analizy te nie wykazały jednak różnic w poziomie ekspresji badanego białka pomiędzy grupą osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , a grupą mutantów *mosaic* traktowanych chlorkiem miedzi (II) (Ryc. 9B).

A.



B.

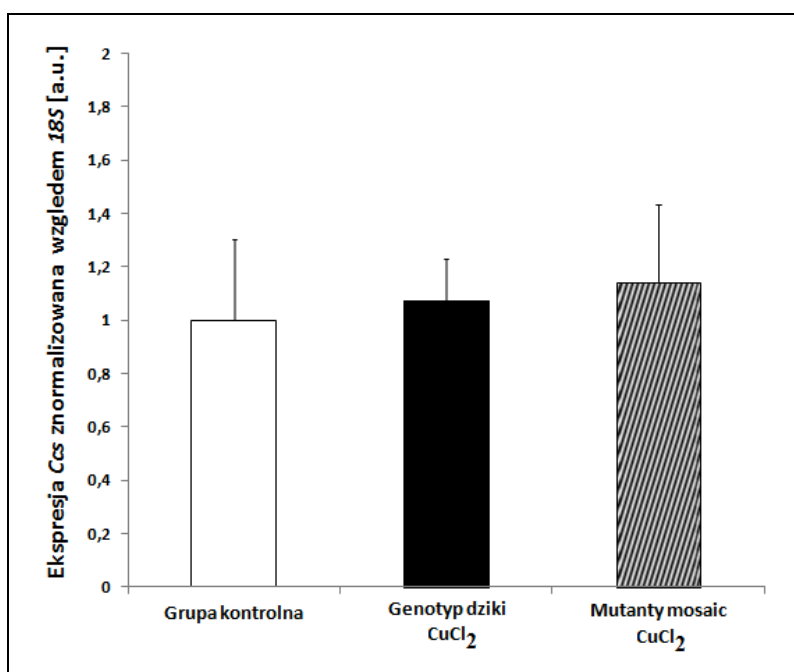


Ryc. 9. Ekspresja białka CCS w nerkach myszy 46-dniowych. A. Wyniki analizy przeprowadzone z użyciem metody Western blot. Na membranie widoczny jest prążek na wysokości około 35 kDa odpowiadający białku CCS. Jako białka referencyjnego użyto aktyny (42 kDa). Do analiz wykorzystano ekstrakty cytoplazmatyczne z nerek pochodzących od trzech osobników z każdej badanej grupy: osobników o genotypie dzikim (+/-(46)), o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(46)), mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (ms/-Cu(46)). B. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białka CCS u poszczególnych grup badanych myszy: osobników o genotypie dzikim, n=3; o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=3; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=3. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice: *P<0,05; **P<0,01.

7. 7. 5. Analiza poziomu ekspresji genu *Ccs* w nerkach – osobniki 6 miesięczne

Wykorzystanie do analiz nerek pochodzących od myszy 6 miesięcznych o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic*, które w ciągu pierwszych 44 dni życia otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II), miało na celu sprawdzenie długotrwałego efektu suplementacji CuCl_2 na ekspresję genu *Ccs*.

Analizie poddano wyniki otrzymane w reakcji real time PCR i porównano ekspresję badanego genu metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Jak wykazały analizy statystyczne nie znaleziono żadnych zmian w poziomie mRNA dla genu *Ccs* pomiędzy badanymi grupami osobników 6 miesięcznych (Wyk.22.).



Wyk. 22. Zmiany poziomu ekspresji genu *Ccs* w nerkach 6 miesięcznych: samców o genotypie dzikim, n=7; samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , n=7; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , n=7. Poziom ekspresji znormalizowano względem ekspresji genu *18S*. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm SD.

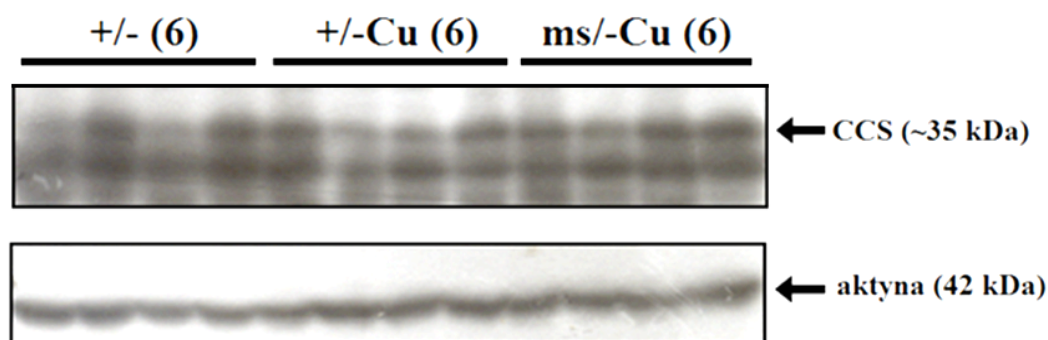
7. 7. 6. Analiza poziomu ekspresji białka CCS w nerkach – osobniki 6 miesięczne

W celu ilościowej analizy poziomu ekspresji białka CCS w nerkach pochodzących od osobników 6 miesięcznych wykonano reakcję Western blot używając frakcji cytoplazmatycznej ekstraktów białkowych z nerek. Ilościowej analizie poddano prążek odpowiadający masie 35 kDa, który odpowiadał frakcji badanego białka CCS. Za pomocą

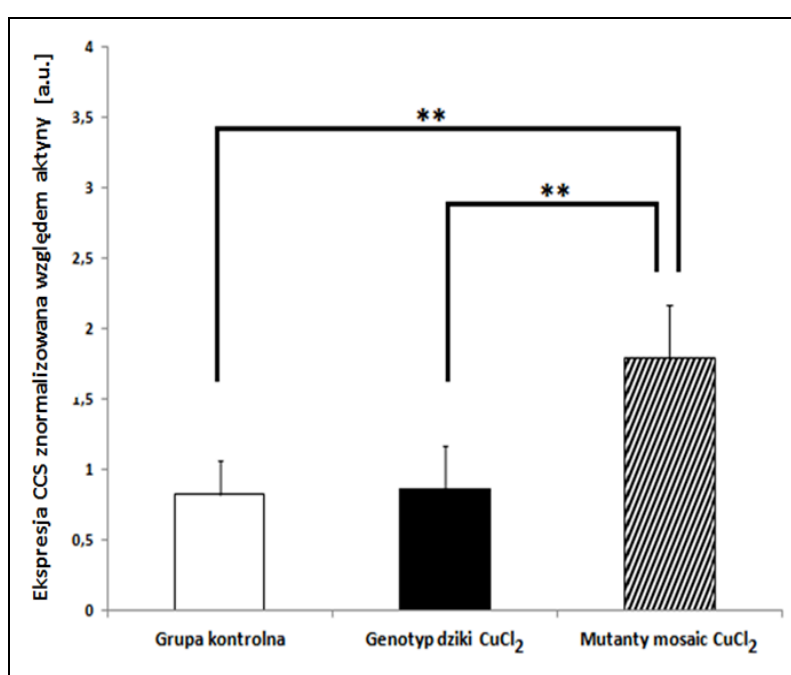
programu komputerowego (Quantity One, BioRad) wykonano analizy densytometryczne, dzięki którym określono zmiany poziomu ekspresji białka CCS. Jako białka referencyjnego użyto aktyny o masie cząsteczkowej 42 kDa.

Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały ekspresję białka CCS w nerkach u wszystkich grup badanych 6 miesięcznych zwierząt (Ryc. 10A). Przeprowadzone analizy densytometryczne nie wykazały różnic w poziomie ekspresji białka CCS pomiędzy grupą osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (+/-Cu(6)), w stosunku do grupy zwierząt +/- (6). Znaleziono jednak wyraźny wzrost ekspresji białka CCS w nerkach myszy mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 zarówno w porównaniu do grupy zwierząt kontrolnych, jak również w porównaniu do osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) (Ryc. 10B).

A.



B.



Ryc. 10. Ekspresja białka CCS w nerkach myszy 6 miesięcznych. A. Wyniki analizy przeprowadzone z użyciem metody Western blot. Na membranie widoczny jest prążek na wysokości około 35 kDa odpowiadający białku CCS. Jako białka referencyjnego użyto aktyny (42 kDa). Do analiz wykorzystano ekstrakty cytoplazmatyczne z nerek pochodzących od czterech osobników z każdej badanej grupy: osobników o genotypie dzikim (+/-(6)), o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ (+/-Cu(6)), mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ (ms/-Cu(6)). B. Wyniki analizy densytometrycznej ekspresji białka CCS u poszczególnych grup badanych myszy: osobników o genotypie dzikim, n=4; o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, n=4; mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂, n=4. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice: **P<0,01.

7. 8. Analiza poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach

Dysmutaza ponadtlenkowa SOD1 jest cytoplazmatycznym białkiem należącym do klasy enzymów, których główną funkcją jest kataliza reakcji dysmutacji anionorodnika nadtlenkowego do tlenu oraz nadtlenku wodoru (Furukawa i O'Halloran 2006, Khare i wsp.

2004). Białko to należy do rodziny czynników rozbudowanego, komórkowego systemu antyoksydacyjnego (Bartosz 2006, Bartosz 2009, Tirzitis i Bartosz 2010). Białko SOD1 bierze udział w walce z negatywnym działaniem wolnych rodników, w momencie przekroczenia fizjologicznego, komórkowego stężenia ROS (Furukawa i O'Halloran 2006, McCord i Fridovich 1969). Procesy aktywacji dysmutazy ponadtlenkowej są zależne zarówno od obecności białka CCS jak i dostępności jonów miedzi w komórkach. Utworzenie heterokompleksu CCS-SOD1 umożliwia przekazanie jonów miedzi z metalochaperonu CCS do nieaktywnej apo-formy białka SOD1, dzięki czemu staje się ono aktywnym holo-enzymem (Wong i wsp. 2000).

Analiza ekspresji białka CCS pokazała, że poziom tego białka spada w odpowiedzi na podniesienie zawartości miedzi w nerkach, co było szczególnie widoczne u myszy 14-dniowych oraz 46-dniowych. Otrzymane w obecnej pracy wyniki skłoniły do analizy poziomu aktywności enzymatycznej SOD1.

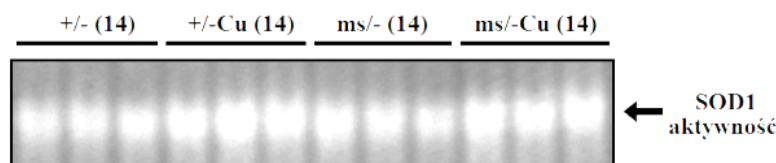
7. 8. 1. Analiza poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach – osobniki 14-dniowe

Analizę poziomu aktywności białka SOD1 wykonano wykorzystując frakcję cytoplazmatyczną ekstraktów białkowych z nerek pochodzących od zwierząt z wszystkich badanych grup. Ekstrakty białkowe rozdzielono w żelu poliakrylamidowym, a następnie używając metody Nitroblue Tetrazolium (NBT)/ryboflawina badano aktywność białka SOD1. Uwidocznione na żelu prążki poddano analizie densytometrycznej wykonanej przy użyciu programu komputerowego (Quantity One, BioRad). Wyniki poziomu aktywności białka SOD1 zostały znormalizowane względem poziomu ekspresji białka SOD1. Ilościowe analizy pozwalające na porównanie poziomu ekspresji białka SOD1 wykonano również przy użyciu metody Western blot. W tym celu wykorzystano frakcje cytoplazmatyczne ekstraktów białkowych nerek pochodzących od wszystkich badanych grup zwierząt. Analizowane próbki były poddane procesom denaturacji termicznej. Analizowano prążki, które odpowiadały masie około 17 kDa, czyli frakcji badanego białka SOD1. Wyniki analizy densytometrycznej poddano analizie statystycznej pozwalającej na ocenienie różnic w poziomie aktywności białka SOD1 pomiędzy badanymi grupami zwierząt.

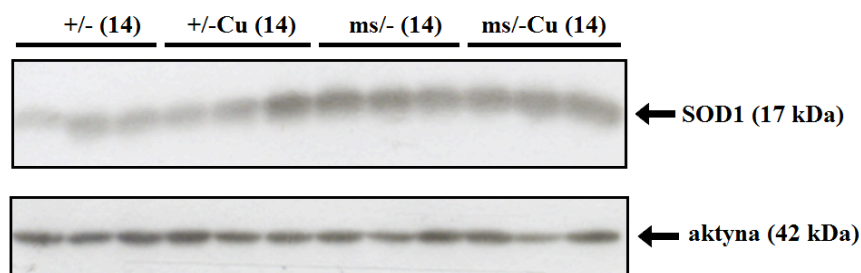
Otrzymane wyniki wykazały aktywność białko SOD1 w nerkach u wszystkich grup badanych zwierząt 14-dniowych (Ryc. 11A). Uzyskane wyniki wskazują, że nie ma statystycznie istotnych różnic w poziomie aktywności SOD1 w nerkach pomiędzy grupą kontrolną (+/-(14)), a grupą osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2

(+/-Cu(14)). Natomiast spadek aktywności tego białka w stosunku do grupy kontrolnej stwierdzono u obydwóch grup mutantów, zarówno zwierząt ms/-(14), jak i ms/-Cu(14). Zaobserwowano również, że aktywność białka SOD1 była wyższa u mutantów, które poddane były terapii CuCl₂ w stosunku do grupy mutantów *mosaic* nietraktowanych CuCl₂. Wyniki analiz nie wykazały różnic statystycznie istotnych pomiędzy grupą osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) (+/-Cu(14)), a grupą samców mutantów poddanych terapii ms/-Cu(14) (Ryc. 11B).

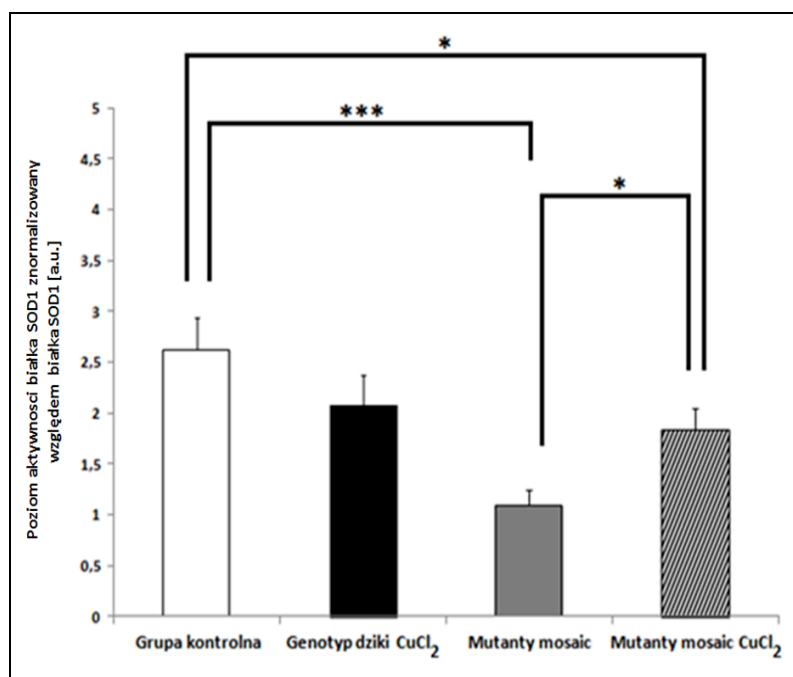
A.



B.



C.



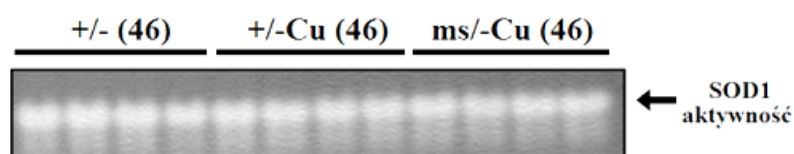
Ryc. 11. Aktywność białka SOD1 w nerkach myszy 14-dniowych. A. Aktywność białka SOD1 badana metodą rozdzielu elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym i reakcji ze związkami Nitroblue Tetrazolium (NBT) oraz ryboflawiną. B. Wyniki analizy ekspresji białka SOD1 przeprowadzone z użyciem metody Western blot. Na membranie widoczny jest prążek na wysokości około 17 kDa odpowiadający białku SOD1. Jako białka referencyjnego użyto aktyny (42 kDa). C. Wyniki analizy densytometrycznej aktywności białka SOD1 znormalizowane względem ekspresji białka SOD1 u poszczególnych grup badanych analizowanych myszy: osobników o genotypie dzikim, o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, mutantów *mosaic*, mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice (ANOVA dwuczynnikowa): *P<0,05; ***P<0,001. Do analiz aktywności białka SOD1 wykorzystano ekstrakty cytoplazmatyczne z nerek pochodzących od trzech osobników z każdej badanej grupy: osobników o genotypie dzikim, o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, mutantów *mosaic*, mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂.

7. 8. 2. Analiza poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach – osobniki 46-dniowe

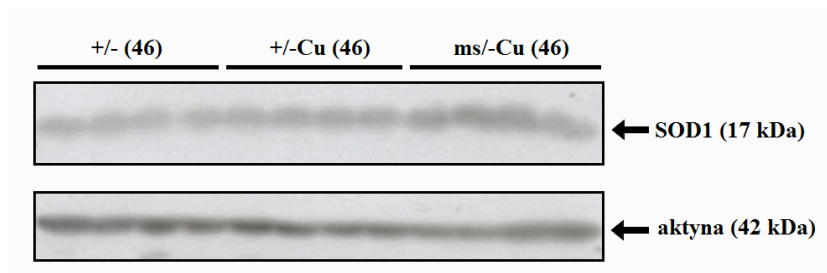
Analizę poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach pochodzących od 46-dniowych osobników przeprowadzono tak, jak to opisano dla osobników 14-dniowych w podrozdziale 8. 8. 1. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej pozwalającej na ocenienie różnic w poziomie aktywności białka SOD1 pomiędzy badanymi grupami zwierząt.

Wyniki przeprowadzonych analiz wskazują, że białko SOD1 wykazuje aktywność w nerkach u wszystkich grup 46-dniowych zwierząt (Ryc. 12A). Przeprowadzone analizy densytometryczne wskazują, że aktywność białka SOD1 jest niższa u obydwóch grup samców, które otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II) w stosunku do grupy kontrolnej. Natomiast porównanie aktywności pomiędzy traktowanymi grupami (+/-Cu(46) i ms/-Cu(46)) wykazało, że jest ona niższa u mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ w porównaniu do grupy osobników dzikich otrzymujących suplementację CuCl₂ (Ryc. 12B).

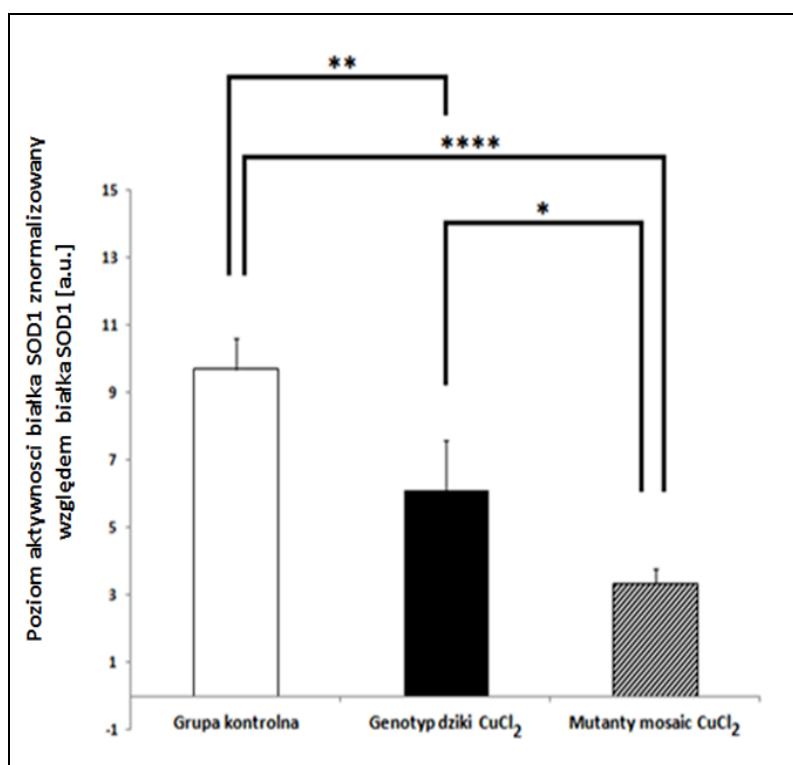
A.



B.



C.



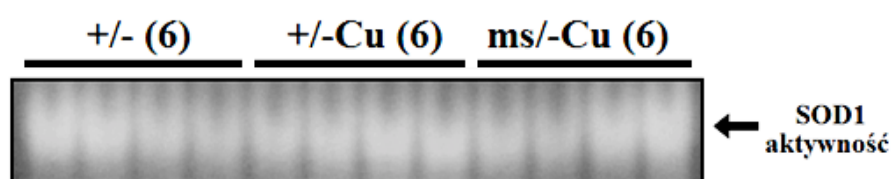
Ryc. 12. Aktywność białka SOD1 w nerkach myszy 46-dniowych. A. Aktywność białka SOD1 badana metodą rozdziału elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym i reakcji ze związkami Nitroblue Tetrazolium (NBT) oraz ryboflawiną. B. Wyniki analizy ekspresji białka SOD1 przeprowadzone z użyciem metody Western blot. Na membranie widoczny jest prążek na wysokości około 17 kDa odpowiadający białku SOD1. Jako białka referencyjnego użyto aktyny (42 kDa). C. Wyniki analizy densytometrycznej aktywności białka SOD1 znormalizowane względem ekspresji białka SOD1 u poszczególnych grup badanych analizowanych myszy: osobników o genotypie dzikim, o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Oznaczono statystycznie istotne różnice (ANOVA dwuczynnikowa): ** $P < 0,01$; **** $P < 0,0001$. Do analiz aktywności białka SOD1 wykorzystano ekstrakty cytoplazmatyczne z nerek pochodzących od czterech osobników z każdej badanej grupy: osobników o genotypie dzikim, o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂.

7. 8. 3. Analiza poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach – osobniki 6 miesięczne

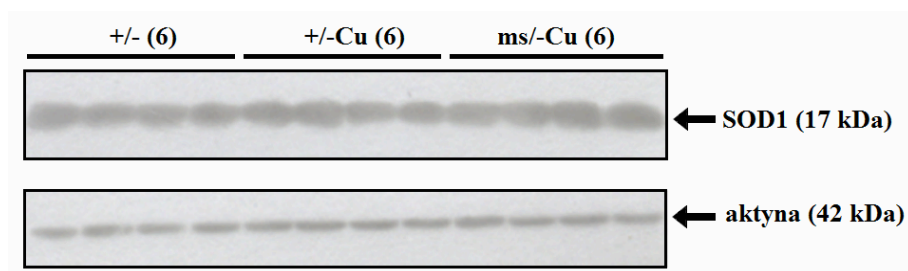
Analizę poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach pochodzących od wszystkich badanych grup osobników 6 miesięcznych wykonano tak, jak to opisano w podrozdziale 8. 8. 1. Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej pozwalającej na ocenienie różnic w poziomie aktywności białka SOD1 pomiędzy badanymi grupami zwierząt.

Otrzymane wyniki wskazują że aktywność białka SOD1 zachodzi w nerkach pochodzących od wszystkich badanych grup 6 miesięcznych zwierząt (Ryc. 13A). Jednak przeprowadzone analizy densytometryczne nie wykazały różnic w poziomie aktywności białka SOD1 pomiędzy badanymi grupami osobników 6 miesięcznych (Ryc. 13B).

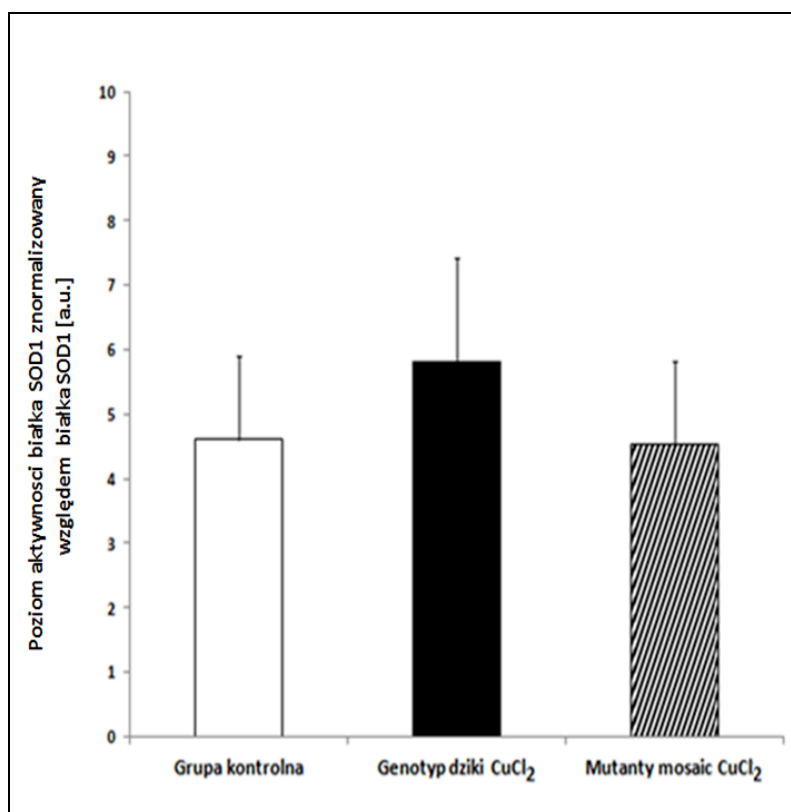
A.



B.



C.



Ryc. 13. Aktywność białka SOD1 w nerkach myszy 6 miesięcznych. A. Aktywność białka SOD1 badana metodą rozdziału elektroforetycznego w żelu poliakrylamidowym i reakcji ze związkami Nitroblue Tetrazolium (NBT) oraz ryboflawiną. B. Wyniki analizy ekspresji białka SOD1 przeprowadzone z użyciem metody Western blot. Na membranie widoczny jest prążek na wysokości około 17 kDa odpowiadający białku SOD1. Jako białka referencyjnego użyto aktyny (42 kDa). C. Wyniki analizy densytometrycznej aktywności białka SOD1 znormalizowane względem ekspresji białka SOD1 u poszczególnych grup badanych analizowanych myszy: osobników o genotypie dzikim, o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂. Wyniki przedstawione jako średnia \pm SD. Do analiz aktywności białka SOD1 wykorzystano ekstrakty cytoplazmatyczne z nerek pochodzących od czterech osobników z każdej badanej grupy: osobników o genotypie dzikim, o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂.

8. Dyskusja

8. 1. Choroba Menkesa, jej zwierzęcy model (mutanty *Atp7a*^{mo-ms}) oraz stosowana terapia chlorkiem miedzi (II)

Miedź jest mikroelementem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania wszystkich organizmów żywych, gdyż wbudowana jest w centrum aktywne enzymów miedziozależnych biorących udział w kluczowych reakcjach zachodzących w komórkach. Jednak ten wysoce reaktywny metal w wysokim stężeniu generuje powstawanie wolnych rodników uszkadzających struktury komórkowe. Dlatego też metabolizm tego pierwiastka, zarówno na poziomie organizmu, jak i na poziomie każdej żywej komórki, podlega ścisłej kontroli, za co odpowiadają trzy grupy białek biorących udział w procesach wchłaniania, wewnątrzkomórkowego transportu, wiązania nadmiaru miedzi, przekazywania jej do cząsteczek apo-enzymów oraz usuwania jonów miedzi z komórki. Pierwszą grupę stanowią transportery błonowe CTR1 i CTR2, które umożliwiają pobieranie miedzi przez komórki. Następną grupą są białka chaperonowe CCS, COX17 i ATOX1, wiążące kationy miedziowe w cytoplazmie i transportujące je w obrębie komórki. Trzecią grupę stanowią białka o budowie ATPaz, ATP7A i ATP7B, pośredniczące we włączaniu kationów miedziowych do apo-enzymów. Są one odpowiedzialne również za utrzymanie stałego poziomu jonów miedzi w komórce (Kim i wsp. 2009, Petris i wsp. 2000, Steveson i wsp. 2003).

U człowieka mutacje w genie kodującym białko ATP7A prowadzą do powstania ciężkich zaburzeń metabolizmu miedzi określanych mianem choroby Menkesa (Kodama i wsp. 2012, Voskoboinik i wsp. 2001). Pacjenci cierpiący na klasyczną postać tej choroby umierają w okresie od 3 do 5 roku życia (Kaler 2013, Tumer i Moller 2010). U chorych brak aktywności białka ATP7A powoduje problemy z wchłanianiem miedzi w początkowym odcinku jelita cienkiego. Miedź wchłaniana jest do enterocytów przy udziale białka CTR1, natomiast brak aktywności białka ATP7A uniemożliwia jego transport do krwioobiegu. U chorych nadmiar miedzi odkładany jest więc w ścianach jelita cienkiego, a tym samym nie dociera do tkanek i narządów całego organizmu, skutkiem czego obserwuje się u pacjentów charakterystyczne objawy związane ze zmniejszoną aktywnością enzymów zależnych od miedzi (Kodama i wsp. 2012, Lutsenko i wsp. 2007, Tumer i Moller 2010). Choroba Menkesa jest chorobą neurodegeneracyjną, a pierwsze objawy neurologiczne pojawiają się u chorych około 2 miesiąca życia (Kaler 2011, Tumer i Moller 2010). U pacjentów w wyniku zaburzeń metabolizmu miedzi obserwuje się regresję rozwojową, drgawki, osłabienie kończyn, problemy na tle motorycznym, problemy ze strony układu pokarmowego, a także problemy

związane z nieprawidłowym funkcjonowaniem układu krążenia (Hamer 1993, Kageyama i wsp. 1997, Kaler i wsp. 2008, Kaler 2011, Kodama i wsp. 2012, Oshio i wsp. 1997, Zaffanello i wsp. 2006).

Bardzo podobne objawy obserwowane są u myszy będących zwierzęcym modelem choroby Menkesa. Są to myszy z mutacją w obrębie genu *Atp7a*, który jest zlokalizowany w locus *mottled* na chromosomie X. U myszy mutantów objawy choroby wywołane są również zaburzeniami w metabolizmie miedzi, co związane jest z brakiem prawidłowej aktywności białka ATP7A (Kodama 1993, Kuo i wsp. 1997, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2004, Lenartowicz i wsp. 2010a, Lenartowicz i wsp. 2015b, Lenartowicz i wsp. 2017). Mutacja *mosaic* należy do grupy mutacji *mottled* i pojawiła się spontanicznie w 1965 roku u myszy niekrewniaczego stada *outbred* w hodowli Zakładu Genetyki i Ewolucjonizmu UJ (Krzanowska 1966). U mutantów *mosaic* występuje mutacja zmiany sensu w egzonie 15 genu *Atp7a* polegająca na zamianie guaniny w pozycji 3009 na cytozynę (Lenartowicz i wsp. 2012a). Transwersja ta prowadzi do zmiany kodonu CGC na kodon CCC, co na dalszych etapach translacji przekłada się na zastąpienie alkalicznego, hydrofilowego i dodatnio naładowanego aminokwasu argininy na obojętny, hydrofilowy aminokwas proliny w pozycji 977 białka ATP7A. Modyfikacje te obejmują rejon zlokalizowany w pobliżu wysoce konserwatywnego motywu CPC znajdującego się w domenie TMD6 (Barry i wsp. 2010, His i Cox 2004, Horn i Tumer 2004, Van den Berghe i wsp. 2007). Motyw ten jest silnie związany z transportem jonów miedzi przez białko ATP7A. Powyższe zmiany w obrębie białka ATP7A leżą u podstaw zaburzonego metabolizmu miedzi u mutantów *mosaic*. Mutacja w obrębie genu *Atp7a* u tych myszy skutkuje produkcją białka ATP7A, które nie wykazuje aktywności dotyczącej zarówno transportu jonów miedzi przez błony komórkowe, jak również włączaniu tych jonów do cząsteczek apo-enzymów. U samców tych miedź akumulowana jest w obrębie jelita cienkiego oraz nerek. Samce te na skutek braku aktywności tyrozynazy wykazują defekt w pigmentacji sierści, a obniżenie aktywności oksydazy lizylowej prowadzi u nich do zaburzeń w strukturze włosów, co równocześnie umożliwia rozpoznanie samców mutantów zaraz po urodzeniu, gdyż występują u nich charakterystycznie skręcone wibrysy. Nieprawidłowości w produkcji neurotransmiterów wywołują u mutantów szereg objawów neurologicznych (niezborność ruchowa, niedowład tylnych kończyn, drgawki) (Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010a, Lenartowicz i wsp. 2011, Niciu i wsp. 2006, Styra 1977, Tanaka i wsp. 1990). Mutacja w genie *Atp7a* dla samców mutantów *mosaic* jest letalna, a zwierzęta te umierają pomiędzy 15, a 17 dniem życia (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz 2011, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2012a). Mutanty *mosaic* są

zwierzęcym modelem dla choroby Menkesa, która występuje u ludzi i zwierzęta te są wykorzystywane do badań w celu opracowania nowych form terapii dla tej choroby (Lenartowicz 2011, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2017).

Jak wykazały badania przeprowadzone w obecnej pracy, jak również wcześniejsze doniesienia pochodzące z literatury, podawanie związków miedzi samcom *mosaic* znosi letalne skutki mutacji i częściowo redukuje występowanie objawów patologicznych. Podobnie podawanie związków miedzi redukowało objawy patologiczne u innych mutantów z grupy *mottled*, takich jak mutanty *macular*, czy *brindled* (Bhadhprasit i wsp. 2012, Kodama i wsp. 2005, Phillips i wsp. 1986, Tanaka i wsp. 1990). W celu otrzymania jak najefektywniejszych rezultatów stosowania u chorych zwierząt terapii, bardzo ważnym jest, aby terapię rozpocząć wkrótce po urodzeniu mutantów, a najpóźniej w 7 dniu życia (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i wsp. 2010b, Phillips i wsp. 1986, Shiraishi i wsp. 1988). W przypadku mutacji *mosaic* samce poddane terapii osiągają dojrzałość, a nawet nieliczne z nich osiągają wiek 12-16 miesięcy (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2017, Styrna 1977).

Jednak, po dzień dzisiejszy, tak dobrych wyników nie udało się osiągnąć u ludzi i choroba Menkesa pozostaje dalej nieuleczalna. U człowieka znalezienie skutecznej terapii znoszącej objawy patologiczne w chorobie Menkesa stanowi nadal poważny problem. Podawanie związków miedzi wydłuża życie pacjentów, jednak tylko częściowo redukuje objawy patologiczne. Najskuteczniejszą formą terapii, która pozwala na redukcję części występujących u pacjentów objawów, takich jak zmniejszenie podatności na infekcje, a także pozwalających na wydłużenie życia chorych, jest podawanie związków miedzi drogą omijającą barierę jelita. W tym celu stosuje się terapie iniekcji roztworów związków miedzi poprzez dożylnie lub podskórne iniekcje. W chwili obecnej najbardziej efektywną formą leczenia pacjentów jest stosowanie iniekcji kompleksu miedź-histydyna. Niezwykle istotnym jest wdrożenie leczenia na jak najwcześniejszych etapach życia pacjentów, kiedy symptomy choroby związane z zaburzeniami układu nerwowego jeszcze nie są w pełni rozwinięte (Aoki 2003, Desai i Kaler 2008, Kaler i wsp. 2008, Kaler i wsp. 2010, Kaler 2013, Kaler 2014, Kodama i wsp. 2011, Kodama i wsp. 2012, Lutsenko i wsp. 2008, Tang i wsp. 2006, Tumer i Moller 2010). Przeprowadzone badania wykazały, że zalecane jest, aby terapię związkami kompleksu miedź-histydyna wprowadzić u chorych noworodków do 30 dnia życia (Vairo i wsp. 2018). Różnice wynikające z efektywności terapii związkami miedzi u ludzi i u myszy wynikają z różnic w zaawansowaniu rozwoju systemu nerwowego u noworodków ludzkich i mysich. Jak dowiedziono u noworodka mysiego stopień zaawansowania rozwoju układu

nerwowego odpowiada temu, jaki występuje u ludzkiego płodu w trzecim trymestrze ciąży, dlatego też wprowadzona u człowieka w okresie postnatalnym terapia redukuje tylko częściowo objawy patologiczne i wydłuża ich życie (Desai i Kaler 2008, Kaler i wsp. 2008, Kodama i wsp. 2011, Kodama i wsp. 2012, Lutsenko i wsp. 2008, Tang i wsp. 2006, Tumer i Moller 2010).

Zarówno u pacjentów z chorobą Menkesa, jak i u myszy *mosaic* stosowanie terapii polegającej na iniekcji związków miedzi prowadzi do przedłużenia życia. Terapie te mają jednak skutki uboczne, które są spowodowane wzrostem zakumulowanego pierwiastka w obrębie nerek, co prowadzi do silnych uszkodzeń tego organu. U myszy *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) obserwuje się występujące głównie w obrębie kory nerki patologiczne zmiany, które obejmują zarówno kłębuszki, jak i kanaliki nerkowe. U tych zwierząt w obrębie kanalików nerkowych występuje degeneracja komórek, nekrozy, liczne lezje, a także charakterystycznie powiększone jądra komórek kanalików (kariomegalia). Z kolei zmiany w obrębie struktury prowadzą do zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu nerek (Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2017).

Badania prowadzone w obecnej pracy z wykorzystaniem mutantów *mosaic* potwierdziły, że podawanie związków miedzi prowadzi do redukcji efektu letalnego mutantów *mosaic* oraz znosi większość objawów patologicznych, takich jak niezdolność ruchowa, niedowład kończyn, drgawki (Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2017). Pomimo tego, że stosowanie terapii chlorkiem miedzi (II) prowadzi do nieodwracalnych i postępujących wraz z wiekiem zmian w obrębie nerek, to uzyskane w obecnej pracy wyniki mogą zostać wykorzystane do dalszych etapów ustalania odpowiedniej terapii u pacjentów z chorobą Menkesa.

8. 2. Analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na ogólną kondycję zwierząt, wyrażającą się przyrostem masy ciała

Przeprowadzone analizy miały na celu określenie, jaki wpływ ma podawanie terapii chlorkiem miedzi (II) na ogólną kondycję zwierząt, wyrażającą się przyrostem masy ciała myszy.

8. 2. 1. Analiza wpływu iniekcji chlorkiem miedzi (II) na zmiany masy ciała oraz fenotypu w okresie od 2 dnia do 6 miesiąca życia – genotyp dziki

Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, że podawanie związków miedzi wdrożone we wczesnym okresie życia postnatalnego ma pozytywny wpływ na masę ciała samców o

genotypie dzikim. Samce o genotypie dzikim, u których rozpoczęto suplementację chlorkiem miedzi (II) w 2 dniu życia wykazywały począwszy od 14 dnia życia wzrost masy ciała w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 1). Ponadto osobniki te rozwijały się znacznie szybciej, o czym mogą świadczyć w pełni otwarte oczy u 14-dniowych samców poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II), podczas gdy osobniki kontrolne miały oczy nadal zamknięte.

Jednak od 16 do 20 dnia życia, pomimo że nie obserwowano różnic statystycznie istotnych w masie ciała pomiędzy osobnikami kontrolnymi, a osobnikami o genotypie dzikim poddanymi suplementacji, to jednak utrzymywała się tendencja do wyższej masy ciała u osobników otrzymujących iniekcję CuCl_2 . Można to tłumaczyć zmianą diety badanych osobników. Około 16 dnia życia myszy przestają być karmione przez matkę, opuszczają gniazdo i zaczynają samodzielnie pobierać pokarm, dlatego też w pierwszym okresie samodzielnego pobierania pokarmu wzrost masy ciała jest wolniejszy niż w pierwszych dwóch tygodniach życia osobniczego (Wyk. 2). Począwszy od 24 dnia samce poddane suplementacji wykazywały już statystycznie istotny wzrost masy ciała w porównaniu ze zwierzętami grupy kontrolnej, a stan ten utrzymywał się nieprzerwanie do 46 dnia życia (Wyk.3., Fot. 3).

Wzrost masy ciała u zwierząt o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II), który obserwowany jest już w początkowym okresie życia postnatalnego, utrzymuje się pomimo zaprzestania suplementacji, o czym świadczą wyniki analizy masy ciała otrzymane dla samców 6 miesięcznych (Wyk. 4, Fot. 4.). Wyniki wcześniejszych badań przeprowadzonych w Zakładzie Genetyki i Ewolucjonizmu wskazują również, że u 5 do 6 miesięcznych samców o geneotypie dzikim, które poddane były suplementacji chlorkiem miedzi (II), stwierdzono wzrost masy ciała w porównaniu do masy ciała zwierząt grupy kontrolnej (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i wsp. 2010b). Badania te wykazały również, że efekt ten utrzymywał się nawet do 12 miesiąca życia zwierząt. Zarówno u 6, jak i u 12 miesięcznych samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji obserwowano nadmiar tkanki tłuszczowej w trakcie sekcji (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i wsp. 2010b). Również badania przeprowadzone na szczurach wykazały, że zwierzęta, które otrzymywały w wodzie pitnej dodatkową ilość miedzi w porównaniu do osobników otrzymujących standardowy pokarm, wykazywały nasilony przyrost masy ciała oraz zwiększoną masę tkanki tłuszczowej. U tych zwierząt odnotowano wzrost negatywnego działania stresu oksydacyjnego w komórkach tłuszczowych, co może prowadzić również do zwiększenia masy tkanki tłuszczowej (Alexey i wsp. 2012). Wyniki licznych badań przeprowadzonych na młodych

prosiętach, które otrzymywały pokarm bogaty w miedź lub były poddane dożylniej iniekcji związkami miedzi, wykazały że, zwierzęta takie miały wzmożony apetyt, co przekładało się na zwiększenie masy ciała (Armstrong i wsp. 2004, Cromwell i wsp. 1998, Zhao i wsp. 2014). Wykazano również, że miedź może być czynnikiem regulującym transkrypcję genów kodujących białka zaangażowane w kontrolę metabolizmu kwasów tłuszczowych, węglowodanów oraz lipidów (Huster i wsp. 2007, Huster i Lutsenko 2007).

8. 2. 2. Analiza wpływu iniekcji chlorkiem miedzi (II) na zmiany masy ciała oraz fenotypu w okresie od 2 dnia do 6 miesiąca życia – mutanty *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*)

U samców mutantów *mosaic*, które nie zostały poddane terapii chlorkiem miedzi (II) zaobserwowano, począwszy od od 8 dnia życia, spadek masy ciała w porównaniu do osobników kontrolnych, (Wyk. 1). Fotografia 1, która przedstawia 14-dniowe osobniki o genotypie dzikim oraz mutantu *mosaic* niepoddanego terapii chlorkiem miedzi (II), ukazuje wyraźną różnicę w wielkości tych zwierząt (Fot. 1). 14-dniowe samce mutanty wykazują depigmentację sierści, a także zaburzoną strukturę w budowie włosów oraz wibrysów. Samce te wykazują silne wyniszczenie organizmu, a także opisane wcześniej, nasilające się z wiekiem objawy świadczące o problemach neurologicznych, takie jak niedowład tylnych kończyn oraz drgawki. Jak wykazały wyniki licznych, wcześniejszych badań (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2010a, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2012a, Lenartowicz i wsp. 2017, Radochońska 1970, Styrna 1977) oraz te, uzyskane w obecnej pracy, mutanty *mosaic*, które nie zostały poddane terapii CuCl_2 umierały pomiędzy 15, a 17 dniem życia.

Objawy związane z zaburzonym transportem miedzi w organizmie, jakie występują u mutantów *mosaic*, w tym spadek masy ciała, nieprawidłowa struktura włosów i ich depigmentacja oraz zaburzenia ze strony ośrodkowego układu nerwowego są podobne do tych, jakie obserwuje się u pacjentów z chorobą Menkesa. U chorych noworodków obserwuje się wzrost masy ciała do około 4 miesiąca życia, czyli do momentu pojawienia się pierwszych objawów choroby. Po tym okresie wzrost masy ciała takich pacjentów jest znacznie wolniejszy w porównaniu do dzieci zdrowych (Aoki 2003, Kaler i wsp. 2008, Kaler i wsp. 2010, Kaler 2013, Kaler 2014, Tumer i Moller 2010).

Podanie chlorku miedzi (II) samcom mutantom *mosaic* od 2 dnia życia z ominięciem bariery jelitowej w postaci iniekcji podskórnej oraz dootrzewnowej pozwoliło na zniesienie efektu letalnego mutacji w genie *Atp7a*, prowadząc do redukcji części objawów związanych z niedoborem miedzi w ich organizmie, głównie tych związanych z układem nerwowym.

Fotografia 2 przedstawia 14-dniowe osobniki o genotypie dzikim oraz mutantu *mosaic*, pochodzące z grup badanych poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) (Fot. 2). U tych zwierząt rozmiary ciała są porównywalne. Ponadto u mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 nie obserwuje się zaburzeń na tle motorycznym (niezborność ruchowa, drgawki). Począwszy od 2 dnia życia aż do 46 dnia życia nie zaobserwowano różnic w masie ciała samców mutantów poddanych terapii CuCl_2 w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 1-3). Również masa ciała 6 miesięcznych samców mutantów *mosaic*, które poddane zostały terapii CuCl_2 nie różni się w porównaniu z osobnikami kontrolnymi (Wyk. 4). Dorosłe, 6 miesięczne mutanty *mosaic*, które poddane były terapii chlorkiem miedzi (II) nie wykazują problemów na tle neurologicznym, poruszają się w sposób prawidłowy, jednak sierść u tych zwierząt jest nadal rozjaśniona (Fot. 4). Otrzymane w obecnej pracy wyniki potwierdzają skuteczność przeprowadzonej terapii u samców mutantów *mosaic*.

Najczęściej stosowanymi związkami miedzi u pacjentów z chorobą Menkesa jest podawany roztwór kompleksu miedź-histydyna. Przeprowadzone badania na pacjentach z chorobą Menkesa wykazały, że wczesne wprowadzenie terapii wpływa pozytywnie na wzrost masy ciała, ogólnoustrojowy rozwój, redukcję objawów na tle neurologicznym, czy polepszenie jakości życia pacjentów. Pomimo, że u pacjentów obserwowano wzrost masy ciała, poziom ten był jednak nadal poniżej prawidłowego zakresu norm (Gu i wsp. 2014, Haddad i wsp. 2018, Kaler i wsp. 2008, Kaler i wsp. 2010, Kaler 2014, Tumer i wsp. 2017, Yoganathan i wsp. 2017).

Podsumowując, przedstawione w obecnej pracy wyniki wykazały, że stosowanie iniekcji chlorkiem miedzi (II) wpływa na wzrost masy ciała zarówno u osobników o genotypie dzikim, jak również u mutantów *mosaic*. Ponadto w przypadku mutantów *mosaic* terapia ta wpływa pozytywnie na redukcję niektórych objawów choroby, takich jak brak drgawek, niedowładu tylnych kończyn czy niezborności ruchowej. Zwierzęta te poruszają się w podobny sposób, jak osobniki zdrowe i dożywają wieku przynajmniej 6 miesięcy

8. 3. Analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na zawartość miedzi w wątrobie

U ssaków wątroba pełni szczególną rolę w metabolizmie miedzi, gdyż jest organem, którego główną rolą jest magazynowanie tego pierwiastka oraz utrzymanie jego prawidłowego poziomu w organizmie. Dostarczona do organizmu wraz z pokarmem miedź jest następnie transportowana wraz z krwią z jelita do wątroby. Za transport jonów miedzi do

wnętrza hepatocytów odpowiedzialne jest głównie białko CTR1 (Kim i wsp. 2009, Larson i wsp. 2010, Wijmenga i Klomp 2004). Jony te są przekazywane z białka CTR1 do wewnątrzkomórkowych transporterów, którymi są białka chaperonowe (ATOX1, CCS, COX17) lub wiązane przez cząsteczki metalotioneiny (MT). Wątroba jest organem, który odznacza się wysoką ekspresją metalotioneiny, co jest związane z jej funkcją jako rezerwuaru miedzi w organizmie. Białko metalotioneina ma zdolność do odwracalnego wiązania nadmiaru jonów miedzi, dzięki czemu w sytuacji wysokiego zapotrzebowania na miedź, rozpada się ono uwalniając związane jony metalu, które następnie zostają wykorzystane przez komórkę (Harada i wsp. 1993, Kelly i Palmiter 1996, Tsujikawa i wsp. 1991, Wijmenga i Klomp 2004). Wątroba odpowiedzialna jest również za usuwanie nadmiaru miedzi z organizmu wraz z żółcią (Dijkstra i wsp. 1996, Huster i Lutsenko 2007, Voskoboinik i wsp. 2001). W przypadku, gdy stężenie miedzi w obrębie hepatocytów jest wysokie, nadmiar pierwiastka jest usuwany przy udziale białka ATP7B do żółci. W ten sposób z organizmu wydalone jest aż 98% zbędnej miedzi (Wijmenga i Klomp 2004).

W obrębie komórek wątroby dochodzi również do syntezy ceruloplazminy. Niefunkcjonalna i mało stabilna forma ceruloplazminy, apo-CP, wiąże kationy miedzi dostarczone przy udziale białka ATP7B, a następnie transportuje je wraz z krwią w postaci funkcjonalnej holo-CP do tkanek całego organizmu. Ceruloplazmina wiąże około 60-95% miedzi w osoczu (DiDonato i Sarkar 1997, Huster i Lutsenko 2007, Van den Berghe i Klomp 2010, Voskoboinik i wsp. 2001). Białko to oprócz transportera miedzi pełni również funkcję miedziozależnej oksydoreduktazy biorącej udział w reakcji utleniania jonów żelaza Fe^{2+} do Fe^{3+} , dzięki czemu stanowi ona niezbędne ogniwo łączące ścieżki metabolizmu miedzi oraz żelaza (Collins i wsp. 2010).

Wątroba jest organem, który odpowiada za prawidłowy metabolizm miedzi nie tylko w okresie życia postnatalnego, ale również w okresie płodowym. U ssaków miedź magazynowana jest w wątrobie już w okresie prenatalnym. Do płodu transportowana jest z krwioobiegu matki przez łożysko, następnie żyłą pępkową dociera do wątroby, gdzie w obrębie hepatocytów zostaje związana przez metalotioneinę, co pozwala na jej akumulację i magazynowanie (Bauerly i wsp. 2005, Davis i Cousins 2000, Hardman i wsp. 2007, Mercer i wsp. 1992, Mohan i wsp. 1995).

Po urodzeniu zawartość miedzi w wątrobie noworodków jest bardzo wysoka i maleje wraz z wiekiem badanych osobników, dlatego też zawartość miedzi w wątrobie osobników dorosłych jest znacznie niższa niż u noworodków i osesków. Noworodki wykorzystują zapasy miedzi odłożone w wątrobie, gdyż na wczesnych etapach życia postnatalnego występuje u

nich ograniczona absorpcja miedzi z pokarmu (Bauerly i wsp. 2005, Chun i wsp. 2017, Lenartowicz i wsp. 2015a, Lenartowicz i wsp. 2017, Van den Berghe i Klomp 2010). Udział genów oraz białek *Atp7a*/ATP7A i *Atp7b*/ATP7B w regulacji metabolizmu miedzi w wątrobie jest różny u osobników młodych i osobników dorosłych. Przeprowadzone analizy ekspresji tych genów wykazały, że w wątrobie młodych zwierząt metabolizm miedzi regulowany jest głównie przez białko ATP7A, natomiast ekspresja genu *Atp7b* jest bardzo niska. Z kolei u dorosłych zwierząt sytuacja jest odwrotna i główną funkcję utrzymania prawidłowego poziomu miedzi w wątrobie przejmuje białko ATP7B (Lenartowicz i wsp. 2010a, Lenartowicz 2011, Lenartowicz i wsp. 2015a, Zatulovskaia i wsp. 2015).

W obecnej pracy materiał doświadczalny stanowiły zarówno samce o genotypie dzikim, u których występuje funkcjonalne białko ATP7A, jak również myszy mutanty *mosaic* cechujących się brakiem aktywności tego białka. Jednym z celów obecnej pracy była analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na zawartość miedzi w wątrobie zarówno u młodych osobników 14-dniowych, jak i dorosłych 46-dniowych oraz 6 miesięcznych. Wpływ podawania chlorku miedzi (II) na zawartość miedzi w wątrobie zostanie przedyskutowany w poniższych rozdziałach obecnej pracy.

8. 3. 1. Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników 14-dniowych

Myszy 14-dniowe są to oseski odżywiające się tylko mlekiem matki. Podawanie chlorku miedzi (II) z pominięciem bariery jelitowej umożliwiło dostarczenie tym zwierzętom dodatkowych ilości miedzi, która bezpośrednio została wchłonięta do krwioobiegu. U zwierząt tych podawana w postaci podskórnych iniekcji miedź została zdeponowana w wątrobie, a jej zawartość w tym organie była różna u samców o genotypie dzikim oraz u samców mutantów *mosaic*.

8. 3. 1. 1. Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Analizy zawartości miedzi w wątrobie myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) wykazały, że u tych zwierząt zawartość badanego pierwiastka jest ponad 8-krotnie wyższa w porównaniu do osobników z grupy kontrolnej (Wyk. 5). W przypadku tej grupy zwierząt dodatkowa podaż miedzi w postaci podskórnej iniekcji CuCl_2 spowodowała magazynowanie tego pierwiastka w wątrobie. Wyniki te jeszcze raz potwierdzają wcześniejsze doniesienia, że wątroba jest organem, który magazynuje nadmiar miedzi dostarczanej do organizmu (Nagamine i Nakajima 2013, Wijmenga i Klomp

2004). Podobne wyniki, wskazujące na znaczny wzrost zawartości miedzi w wątrobie, otrzymano suplementując zarówno młode myszy, jak i małpy (*Macaca mulatta*) związkami miedzi (Araya i wsp. 2011, Prohaska 1984). Nadmiar miedzi dostarczany do wątroby zostaje związany w hepatocytach przez metalotioneinę (Coyle i wsp. 2002, Leone i wsp. 1985, Nagamine i Nakajima 2013). Potwierdzają to wyniki analiz przeprowadzonych na komórkach hepatocytów pierwotnych hodowanych w medium o podwyższonym stężeniu miedzi. W komórkach takich następował wzrost ekspresji metalotioneiny (Chun i wsp. 2017).

Wyniki badań przedstawione w obecnej pracy wskazują, że u młodych 14-dniowych osobników o genotypie dzikim suplementowanych CuCl_2 nadmiar miedzi magazynowany jest w wątrobie, ale nie jest uwalniany do krwioobiegu. Wcześniejsze doniesienia wskazują, że u tak suplementowanych samców poziom badanego pierwiastka w osoczu jest porównywalny z tym, jaki występuje u osobników kontrolnych (Lenartowicz i wsp. 2017). Jednakże u 14-dniowych, suplementowanych samców o genotypie dzikim odnotowano wzrost ceruloplazminy w osoczu, co może wskazywać na zwiększony transport jonów miedzi do pozostałych tkanek organizmu przy udziale tego białka (Lenartowicz i wsp. 2017). U młodych 14-dniowych myszy prawdopodobnie nadmiar miedzi usuwany jest wraz z żółcią. Żółć produkowana jest już u osesków i gromadzona w woreczku żółciowym, co zaobserwowano podczas preparowania tkanek. Taką sugestię popierają również wyniki analiz wykonanych na młodych szczurach, które wykazały, że usuwanie miedzi z organizmu wraz z żółcią rozpoczyna się u tych zwierząt około 14-16 dnia życia, co odpowiada wiekowi myszy 14-dniowych (Bauerly i wsp. 2005).

Gromadzenie miedzi w wątrobie jest najprawdopodobniej związane z oszczędną gospodarką miedzi u osesków, u których, jak już wspomniano wcześniej, proces absorpcji miedzi w jelicie cienkim z pokarmu jest silnie ograniczony (Bauerly i wsp. 2005, Olivares i wsp. 2002, Van den Berghe i Klomp 2010). Zmagazynowany w wątrobie w dużych ilościach pierwiastek zostaje wykorzystany na dalszych etapach rozwoju. U zwierząt suplementowanych CuCl_2 dostarczenie dodatkowej ilości miedzi wpływa również na pokrycie wysokiego zapotrzebowania organizmu na ten mikroelement w trakcie dynamicznego okresu rozwojowego. Jak wykazały przeprowadzone w obecnej pracy badania, samce o genotypie dzikim suplementowane CuCl_2 rozwijały się szybciej niż samce kontrolne, co zostało omówione we wcześniejszych rozdziałach dyskusji. Równocześnie akumulacja miedzi w wątrobie w przypadku zwierząt suplementowanych chlorkiem miedzi (II) zapobiega też nadmiernemu wzrostowi poziomu tego pierwiastka w innych organach i chroni młode

myszy przed toksycznym działaniem wysokiego stężenia miedzi (Bauerly i wsp. 2005, Lenartowicz i wsp. 2017, Van den Berghe i Klomp 2010).

Bardzo cennym i jednocześnie uzupełniającym powyższe hipotezy będzie przeprowadzenie analiz zawartości miedzi w kale 14-dniowych zwierząt. Wyniki te pozwoliłyby określić, czy u młodych zwierząt o genotypie dzikim nadmiar miedzi, która zostaje dostarczona do organizmu poprzez podanie iniekcji CuCl_2 zostaje w całości zmagazynowany w wątrobie, czy też po części zostaje usunięty wraz z żółcią.

8. 3. 1. 2. Analiza zawartości miedzi w wątrobie mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) niepoddanych terapii CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Wyniki analiz zawartości miedzi w wątrobie pochodzącej od 14-dniowych mutantów *mosaic* wykazały, że zawartość badanego pierwiastka u tych osobników jest znacznie niższa w porównaniu do osobników o genotypie dzikim (Wyk. 5). Podobne wyniki uzyskano analizując zawartość miedzi w wątrobie u 11-dniowych mutantów *macular* oraz 12-dniowych mutantów *brindled*, u których poziom badanego pierwiastka w wątrobie był kolejno 11-krotnie oraz 8-krotnie niższy w porównaniu do osobników kontrolnych (Camakaris i wsp. 1979, Prohaska 1984). Wyniki te oraz wyniki przedstawiane w obecnej pracy wskazują, że u samców z mutacją w genie *Atp7a* dochodzi do niedoboru tego pierwiastka w wątrobie już w życiu płodowym. W przypadku mutantów *mosaic* oraz pozostałych mutantów z grupy *mottled*, brak prawidłowo funkcjonującego białka ATP7A uniemożliwia transport jonów miedzi z krwioobiegu matki do płodu, przez co jony metalu zostają uwięzione w łożysku. To z kolei ogranicza transport tego pierwiastka do wątroby płodu (Hardman i wsp. 2007, Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz 2011, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2015a, Lenartowicz i wsp. 2017). Zburzenia transportu miedzi przez łożysko powodują, że we wczesnym okresie postnatalnym samce mutanty nie mogą wykorzystywać zmagazynowanej w wątrobie w okresie prenatalnym miedzi, cierpią na silny ogólnoustrojowy niedobór tego pierwiastka, co w konsekwencji prowadzi do rozwoju szeregu objawów patologicznych (Camakaris i wsp. 1979, Cecchi i wsp. 1997, Chun i wsp. 2017, Kuo i wsp. 1998, Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2015a, Lenartowicz i wsp. 2017, Prohaska 1984, Pyatskowitz i Prohaska 2008). Ponadto u takich osesków niedobór miedzi nie może być uzupełniony wraz z pokarmem, jakim jest mleko matki, gdyż brak aktywności białka ATP7A u tych zwierząt uniemożliwia wchłanianie tego pierwiastka w jelicie cienkim. Potwierdzają to również wyniki analiz wskazujące, że u osesków mutantów

mottled zawartość miedzi w jelicie cienkim była znacznie wyższa niż u samców o genotypie dzikim (Lenartowicz i Sasuła 2000, Shiraishi i wsp. 1988, Yoshimura 1994).

Wyniki wcześniejszych badań wykazały, że u mutantów wytworzone zostały mechanizmy, które mają na celu zniwelowanie efektów ogólnoustrojowego niedoboru miedzi (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz 2011, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2017). U ssaków miedź zmagazynowana w wątrobie może być uwalniania przy udziale białka ATP7B, które w hepatocytach wiąże jony tego pierwiastka do cząsteczek białka ceruloplazminy, która następnie jest wydzielana do krwioobiegu (Di Donato i Sarkar 1997, Hellman i wsp. 2002, Wijmenga i Klomp, 2004). Wiadomo jednak, że we wczesnych etapach życia prenatalnego, to jednak nie białko ATP7B, ale właśnie ATP7A odpowiada za uwalnianie jonów miedzi z wątroby (Lenartowicz i wsp. 2010a, Lenartowicz 2011, Lenartowicz i wsp. 2015a, Zatulovskaia i wsp. 2015). Opublikowane w roku 2011 wyniki analiz wykazały, że u 14-dniowych mutantów *mosaic*, pomimo niskiej zawartości miedzi w wątrobie, ekspresja genu *Atp7a* jest wyższa w porównaniu do ekspresji tego genu u osobników o genotypie dzikim (Lenartowicz i wsp. 2011). Wyniki te mogą sugerować, że u osesków mutantów *mosaic* ogólnoustrojowy niedobór miedzi może być związany zarówno z niską akumulacją tego pierwiastka w wątrobie w życiu płodowym, jak również zaburzonym uwalnianiem miedzi do krwioobiegu z komórek hepatocytów we wczesnym okresie życia postnatalnego. Pomimo iż u mutantów *mosaic* białko ATP7B jest aktywne, to jak wykazały przeprowadzone badania, poziom ceruloplazminy w surowicy krwi jest u tych zwierząt niższy niż u myszy kontrolnych, co może wiązać się z niską zawartością miedzi w hepatocytach (Lenartowicz i wsp. 2017). Bardzo prawdopodobnym jest, że niski poziom miedzi w wątrobie 14-dniowych mutantów *mosaic* może wpływać również na ograniczony transport jonów miedzi do żółci u tych zwierząt. Przeprowadzone przez grupę J. Mann i współautorów badania na 7-dniowych mutantach *brindled* wykazały znaczny spadek poziomu miedzi w żółci u tych zwierząt (Mann i wsp. 1979).

8. 3. 1. 3. Analiza zawartości miedzi w wątrobie mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Jak wykazały wyniki analiz przeprowadzonych w ramach obecnej pracy, podawanie iniekcji chlorku miedzi (II) wpływa na wzrost zawartości miedzi w wątrobie samców mutantów *mosaic* w porównaniu do mutantów nieotrzymujących terapii (Wyk. 5). Poziom miedzi u osobników poddanych terapii był prawie 2-krotnie wyższy niż u mutantów *mosaic*. Jednak zawartość miedzi w wątrobie mutantów otrzymujących iniekcję CuCl_2 była ciągle

niższa niż u osobników grupy kontrolnej, jak również znacznie niższa w porównaniu z grupą osobników o genotypie dzikim otrzymujących suplementację CuCl_2 (Wyk. 5).

Podobne do przedstawionych w obecnej pracy wyniki otrzymano u 12-dniowych mutantów *brindled*, u których również podawano chlorek miedzi (II) w początkowym okresie życia postnatalnego. U tych zwierząt po zastosowaniu terapii CuCl_2 poziom miedzi w wątrobie wzrósł, jednak dalej był niższy niż u samców kontrolnych o genotypie dzikim (Prohaska 1984). Podobne wyniki otrzymano również poddając terapii związkami miedzi młode mutanty *macular* (Kodama i wsp. 2005). Jak wskazują wyniki przytoczonych badań i te przedstawione w obecnej pracy, u wszystkich badanych grup mutantów *mottled* po podaniu chlorku miedzi (II) nastąpił wzrost zawartości tego pierwiastka w wątrobie.

U mutantów *mosaic* gen *Atp7b* jest aktywny i na jego matrycy produkowane jest funkcjonalne białko. W wątrobie samców mutantów *mosaic* dochodzi więc do włączania miedzi do cząsteczek apo-ceruloplazminy, dlatego też u samców mutantów poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) zaobserwowano wzrost poziomu ceruloplazminy w osoczu (Lenartowicz i wsp. 2017). Podobne wyniki do przedstawionych w obecnej pracy otrzymano w przypadku 12-dniowych mutantów *brindled*, u których nastąpił wzrost ceruloplazminy w osoczu po zastosowaniu terapii podań chlorku miedzi (II) (Prohaska 1984).

Wyniki przedstawione w obecnej pracy mogą wskazywać, że u mutantów *mosaic* miedź dostarczona do wątroby wraz z podskórną iniekcją CuCl_2 zostaje w bardzo krótkim czasie zużyta na potrzeby organizmu, o czym świadczy brak akumulacji tego pierwiastka w wątrobie.

8. 3. 2. Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników 46-dniowych

Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników 46-dniowych miała na celu sprawdzenie, jak długotrwałe podawanie, przez okres 44 dni, chlorku miedzi (II) wpływa na zawartości tego pierwiastka w badanym organie u samców z prawidłowo funkcjonującym genem *Atp7a* i u myszy mutantów *mosaic*.

8. 3. 2. 1. Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 46-dniowe

U samców 46-dniowych miedź, dostarczana była do organizmu wraz z pokarmem, a także przez pierwsze 44 dni życia była podawana w postaci iniekcji chlorku miedzi (II). Przedstawione w obecnej pracy wyniki nie wykazały różnic statystycznie istotnych w poziomie zawartości miedzi w wątrobie osobników o genotypie dzikim, które były poddane

suplementacji chlorkiem miedzi (II) w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 6). Na podstawie otrzymanych wyników można wysunąć wnioski, że u myszy z prawidłowo funkcjonującymi białkiem ATP7A oraz ATP7B możliwe jest utrzymanie homeostazy tego pierwiastka w wątrobie, pomimo ciągłej suplementacji chlorkiem miedzi (II). U myszy z prawidłowo funkcjonującymi genami/białkami *Atp7a*/ATP7A i *Atp7b*/ATP7B miedź pochodząca zarówno z pokarmu, jak i iniekcji CuCl_2 zużywana jest w sposób ciągły na potrzeby organizmu, a jej nadmiar jest usuwany do żółci, a także, w niewielkiej części, wraz z moczem (Di Donato i Sarkar 1997, Linz i Lutsenko 2007, Wijmenga i Klomp 2004).

Samce o genotypie dzikim poddane suplementacji CuCl_2 rozwijały się prawidłowo, a wręcz w porównaniu do osobników grupy kontrolnej, ich przyrost masy ciała był większy, co może wskazywać, że dzięki sprawnie zachodzącym procesom metabolicznym możliwe jest utrzymanie prawidłowej homeostazy tego pierwiastka w wątrobie 46-dniowych osobników o genotypie dzikim. Powyższe sugestie wymagają jednak potwierdzenia w postaci przeprowadzenia dodatkowych analiz zawartości miedzi w kale tych zwierząt, a także zbadania poziomu ceruloplazminy w osoczu krwi.

8. 3. 2. 2. Analiza zawartości miedzi w wątrobie mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 46-dniowe

U 46-dniowych myszy mutantów *mosaic* podawanie chlorku miedzi (II) w postaci iniekcji jest jedynym źródłem miedzi dostarczanej do organizmu, gdyż zmutowane samce nie przyswajają miedzi pochodzącej z pokarmu (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2010a, Lenartowicz i wsp. 2017). Przeprowadzone analizy zawartości miedzi w wątrobie pochodzącej od samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 wykazały, że u tych zwierząt poziom badanego pierwiastka jest niższy w porównaniu do osobników o genotypie dzikim (Wyk. 6). Pomimo, że samce mutanty korzystają tylko z miedzi dostarczonej w postaci iniekcji, to jednak jest ona wystarczająca, aby znieść letalny efekt mutacji oraz zredukować występowanie patologicznych objawów. Jak już wspomniano wcześniej, masa 46-dniowych mutantów *mosaic* była bardzo podobna do tej, którą obserwuje się u osobników o genotypie dzikim, co wskazuje na prawidłowy rozwój badanych samców (Wyk. 3). U myszy mutantów *mosaic* w komórkach hepatocytów występuje funkcjonalne białko ATP7B, które odpowiada za włączanie jonów miedzi do apo-formy ceruloplazminy (Lenartowicz i wsp. 2017). Ciągła podaż tego pierwiastka jest najprawdopodobniej wystraczająca, aby proces ten zachodził w sposób prawidłowy. Należy jednak przeprowadzić dodatkowe analizy zawartości ceruloplazminy w osoczu tych zwierząt, aby w pełni potwierdzić taką sugestię.

Interesujące byłoby również, aby sprawdzić, w jakim stopniu u tej grupy mutantów miedź wydalana jest do żółci i usuwana wraz z kałem. W tym celu należy przeprowadzić analizę miedzi w kale mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II).

8. 3. 3. Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników 6 miesięcznych

Wykorzystanie do analiz wątroby pochodzącej od myszy 6 miesięcznych o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic*, które w ciągu pierwszych 44 dni życia otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II), miało na celu sprawdzenie długotrwałego efektu suplementacji CuCl_2 na poziom zawartości miedzi w wątrobie badanych zwierząt.

8. 3. 3. 1. Analiza zawartości miedzi w wątrobie osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 6 miesięczne

U myszy 6 miesięcznych źródłem miedzi była tylko dieta, ponieważ suplementację chlorkiem miedzi (II) zakończono w 44 dniu życia tych zwierząt. Wyniki zawartości miedzi w wątrobie zwierząt 6 miesięcznych o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 wykazały, że w porównaniu do osobników kontrolnych nie występują różnice statystycznie istotne pomiędzy tymi grupami zwierząt (Wyk. 7). Wyniki uzyskane dla osobników 6 miesięcznych bardzo przypominają te uzyskane dla zwierząt 46-dniowych, pomimo, że u osobników 46-dniowych źródłem miedzi były zarówno dieta, jak i suplementacja CuCl_2 (Wyk. 6). U osobników 6 miesięcznych o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 również poziom ceruloplazminy w osoczu był porównywalny do poziomu obserwowanego w grupie kontrolnej (Lenartowicz i wsp. 2017). Otrzymane wyniki sugerują, że długotrwałe podawanie chlorku miedzi (II) (od 2 do 44 dnia życia) nie wpływa na zawartość miedzi w wątrobie osobników 6 miesięcznych. U myszy tych białka ATP7A oraz ATP7B są aktywne, co zapewnia prawidłowy metabolizm miedzi w wątrobie, jak również na poziomie ogólnoustrojowym. U zwierząt 6 miesięcznych miedź dostarczana regularnie wraz z pokarmem zostaje zabsorbowana w jelitach, a następnie zostaje zużyta na potrzeby metaboliczne, natomiast jej nadmiar zostaje wydzielony do żółci i wydalony z kałem (Nagamine i Nakajima 2013, Wijmenga i Klomp 2004).

8. 3. 3. 2. Analiza zawartości miedzi w wątrobie mutantów *mosaic* ($\text{Atp7a}^{\text{mo-ms}}$) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 6 miesięczne

U 6 miesięcznych mutantów brak aktywności białka ATP7A ogranicza możliwość wchłaniania tego pierwiastka z pokarmu, dlatego też jedynym źródłem miedzi u tych zwierząt

były niewielkie zapasy tego pierwiastka zmagazynowane w wątrobie w trakcie podawania iniekcji CuCl_2 (od 2 do 44 dnia życia). W grupie 6 miesięcznych samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 odnotowano wyraźny spadek zawartości miedzi w wątrobie w porównaniu do zwierząt grupy kontrolnej (Wyk. 7). U mutantów tych zapasy miedzi w wątrobie ulegają stopniowemu wyczerpaniu, dlatego też obserwuje się niższą zawartość tego pierwiastka w tym organie w porównaniu do myszy o genotypie dzikim. Niską zawartość miedzi w wątrobie stwierdzono również u 3 miesięcznych mutantów *brindled*, które były suplementowane związkami miedzi tylko w 7 i 9-tym dniu życia (Gulec i Collins 2013).

U 6 miesięcznych mutantów *mosaic* stwierdzono również wyraźny spadek poziomu miedzi w osoczu w porównaniu do osobników kontrolnych. Równocześnie poziom ceruloplazminy w osoczu tych zwierząt wykazywał tendencję spadkową w porównaniu do grupy zwierząt o genotypie dzikim, jednak różnice te nie były statystycznie istotne (Lenartowicz i wsp. 2017). Podobnie, u mutantów *brindled* obniżenie poziomu miedzi w wątrobie prowadziło do spadku aktywności ceruloplazminy (Gulec i Collins 2013). Spadek aktywności tego białka zaobserwowano również w osoczu dorosłych szczurów, które hodowane były w warunkach niedoboru miedzi w pokarmie (Ranganathan i wsp. 2011).

Przedstawione w obecnej pracy wyniki świadczyć mogą o tym, iż pomimo, że u 6 miesięcznych mutantów *mosaic* poziom zmagazynowanej w wątrobie miedzi jest stosunkowo niski, jest on jednak wystarczający do utrzymania prawidłowych funkcji tego organu i nie wpływa negatywnie na funkcję czy strukturę tego organu, o czym świadczyć mogą również wyniki przedstawione w pracy licencjackiej K. Tylek. Wyniki analizy histologicznej nie wykazały patologicznych zmian w wątrobie u 6 miesięcznych mutantów *mosaic*, które przez pierwsze 44 dni życia otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II) (praca licencjacka K. Tylek 2017 – dane niepublikowane).

8. 4. Analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na zawartość miedzi w nerkach

W nerkach zarówno u ludzi, jak i u zwierząt, w warunkach fizjologicznych jony miedzi podlegają procesowi filtracji kłębuszkowej, trafiając do moczu pierwotnego, z którego następnie są ponownie reabsorbowane do krwioobiegu. Proces reabsorpcji zachodzi w komórkach kanalików nerkowych, do których jony miedzi są wchłaniane z moczu pierwotnego przy udziale białka CTR1 (Larson i wsp. 2010, Wijmenga i Klomp 2004). W komórkach tych jony miedzi łączone są z białkiem ATOX1 i transportowane do aparatu Golgiego, gdzie następuje ich przyłączanie do białka ATP7A. Białko ATP7A wraz ze

związanymi jonami miedzi pakowane jest w pęcherzyki cytoplazmatyczne i transportowane do błony komórkowej (Lutsenko i wsp. 2007). W kanalikach proksymalnych białko ATP7A zlokalizowane jest również w obrębie błony bazolateralnej, co umożliwia transport miedzi przez błonę komórkową do oplatających kanaliki naczyń krwionośnych, dzięki temu jony miedzi mogą zostać ponownie wchłonięte do krwi (Kirby i wsp. 1998, Lenartowicz 2011, Linz i wsp. 2008).

Ekspresja zarówno genu, jak i białka *Atp7a*/ATP7A w nerkach myszy jest wysoka i stwierdzono ją już w około 18 dniu życia płodu (E18.5) (Kuo i wsp. 1997, Linz i wsp. 2008, Murata i wsp. 1997). W życiu postnatalnym poziom ekspresji tego genu jest niższy u nowonarodzonych osesków mysich i wzrasta wraz z wiekiem (Lenartowicz 2011).

Rozwój nerki u myszy rozpoczyna się w około 10 dniu życia płodowego i zostaje zakończony około 7-8 dnia życia postnatalnego (Woolf 1997). Otrzymane wyniki zawartości miedzi w nerkach u noworodków wskazują, że procesy reabsorpcji tego pierwiastka z moczu rozpoczynają się już w okresie prenatalnym i nasilają się we wczesnych etapach okresu postnatalnego (Lenartowicz 2011, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2015b, Lenartowicz i wsp. 2017). Zjawisko to jest związane z bardzo dużym zapotrzebowaniem młodego, będącego w okresie intensywnego wzrostu, organizmu na niezbędne mikroelementy (Bauerly i wsp. 2005, Davis i Cousins 2000, Hardman i wsp. 2007, Lenartowicz i wsp. 2015b, Mercer i wsp. 1992, Mohan i wsp. 1995, Van den Berghe i Klomp 2010). U noworodków głównym źródłem miedzi są zapasy tego pierwiastka zmagazynowane w wątrobie, w okresie życia prenatalnego, dlatego gospodarka miedzi w ich organizmie jest bardzo oszczędna. U osesków myszy miedź jest bardzo intensywnie reabsorbowana w nerkach, co potwierdzają badania nad lokalizacją białka ATP7A w kanalikach nerkowych myszy będących w różnym wieku. W korze nerki u osesków, w komórkach nabłonkowych kanalików nerkowych, ekspresję białka ATP7A stwierdzono głównie w obrębie błony bazolateralnej, co potwierdza zachodzące procesy reabsorpcji miedzi z komórek kanalików do krwioobiegu (Linz i wsp. 2008). U myszy, 14-dniowe oseski w dalszym ciągu korzystają z miedzi zmagazynowanej w wątrobie, jednak zaczynają już pobierać miedź dostarczaną wraz z pokarmem matki (Lenartowicz i wsp. 2011). Jednak, jak wspomniano już wcześniej, procesy absorpcji tego pierwiastka przez komórki jelita są u młodych zwierząt ograniczone (Bauerly i wsp. 2005, Olivares i wsp. 2002, Van den Berghe i Klomp 2010). Prawdopodobnie intensywny proces reabsorpcji miedzi w nerkach zachodzi nawet do trzeciego tygodnia życia myszy, na co mogą wskazywać wyniki analiz przeprowadzone u zwierząt 22-dniowych, u których ekspresję białka ATP7A w nerkach stwierdzono zarówno w obrębie błony bazolateralnej komórek

nabłonkowych kanalików nerkowych, jak również w obrębie błona aparatu Golgiego tych komórek (Linz i wsp. 2008). Proces reabsorpcji miedzi w nerkach nie kończy się we wczesnym okresie postnatalnym. Jest on kontynuowany w dalszym ciągu życia osobniczego, o czym świadczy opisana ekspresja genu *Atp7a* w nerkach myszy 6 miesięcznych, jednak u myszy dorosłych ekspresja tego genu była znacząco niższa niż u myszy młodych (Lenartowicz 2011). Badania ekspresji białka ATP7A w komórkach kanalików nerkowych u myszy dorosłych wykazały, że białko to zlokalizowane jest głównie w błonach aparatu Golgiego, co wskazuje na to, że transport miedzi do krwioobiegu nie zachodzi u tych zwierząt tak intensywnie, jak u myszy młodych (Linz i wsp. 2008). U dorosłych, 6 miesięcznych osobników, miedź dostarczana jest do organizmu wraz z pokarmem, a następnie zostaje wykorzystana na potrzeby metabolizmu. Zarówno u młodych, jak i dorosłych zwierząt zbędne ilości miedzi zostają usunięte wraz z żółcią oraz w małym procencie wraz z moczem (Di Donato i Sarkar 1997, Linz i Lutsenko 2007, Wijmenga i Klomp 2004).

U pacjentów z chorobą Menkesa oraz u myszy mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*), proces reabsorpcji miedzi z moczu jest zaburzony. Jony miedzi transportowane są u nich do wnętrza komórek kanalików nerkowych przy udziale białka CTR1, ale nie podlegają procesom reabsorpcji do krwioobiegu, co spowodowane jest brakiem aktywności genu *ATP7A/Atp7a* oraz białka ATP7A. Potwierdziły to wyniki wcześniejszych badań które wykazały, że u samców mutantów *mosaic* oraz u innych mutantów z grupy *mottled*, takich jak *brindled*, czy *macular*, zaburzenia metabolizmu miedzi prowadzą do odkładania nadmiaru tego pierwiastka w nerkach (Kirby i wsp. 1998, Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010b, Linz i wsp. 2008, Suzuki-Kurasaki i wsp. 1997). Jak wykazały badania przeprowadzone na mutantach *mosaic* akumulacja miedzi w tym organie prowadzi do licznych zaburzeń zarówno funkcji, jak i struktury nerek u myszy mutantów (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010a, Lenartowicz 2011). Brak aktywności białka ATP7A prowadzi również do odkładania miedzi w nerkach u pacjentów z chorobą Menkesa (Kim i wsp. 2019, Zaffanello i wsp. 2006).

Terapia polegająca na podawaniu chlorku miedzi (II) samcom mutantom *mosaic* z pominięciem bariery jelitowej przedłuża życie tych zwierząt oraz redukuje objawy chorobowe. Terapia ta ma jednak skutki uboczne spowodowane wzrostem akumulacji miedzi w nerkach. Przeprowadzone badania na mutantach *mosaic* wykazały, że akumulacja miedzi w nerkach powoduje uszkodzenie struktury tego organu. Patologiczne zmiany obserwowano w obrębie całej kory nerki (zmiany morfologiczne w obrębie zarówno kłębuszków, jak i kanalików nerkowych). Zmienione kanaliki nerkowe miały powiększoną średnicę.

Obserwowano w nich degeneracje i zamieranie komórek nabłonkowych oraz występowanie komórek z charakterystycznymi powiększonymi jądrami komórkowymi (kariomegalia). Zmiany patologiczne nasilały się wraz wiekiem samców *mosaic* i u dorosłych samców mutantów obserwowano zmiany nekrotyczne w obrębie kory nerki (Lenartowicz i wsp. 2010b). W wielu przypadkach proces nekrozy był tak zaawansowany, że dochodziło do zniszczenia błony podstawnej i połączenia zdegenerowanych kanalików, co z kolei prowadziło do wytworzenia licznych lezji, obserwowanych w korze nerek u mutantów *mosaic*. W budowie patologicznie zmienionych kłębuszków nerkowych obserwowano znaczne powiększenie torebek Bowmana prowadzące do poszerzenia przestrzeni moczowej. Znajdowano również zdegenerowane kłębuszki nerkowe oraz kłębuszki otoczone pogrubioną torebką Bowmana wykazujące cechy zwłóknienia. Zmianom tym towarzyszyły liczne nacieki limfocytarne świadczące o toczącym się w nerkach stanie zapalnym (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz 2011, Lenartowicz i wsp. 2011).

8. 4. 1. Analiza zawartości miedzi w nerkach osobników 14-dniowych

Przeprowadzone analizy zawartości miedzi w nerkach myszy 14-dniowych miały na celu sprawdzenie, jak podawanie chlorku miedzi (II) w początkowym okresie życia wpływa na zawartość tego pierwiastka w badanym organie u zwierząt o genotypie dzikim oraz u mutantów *mosaic*.

8. 4. 1. 1. Analiza zawartości miedzi w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

U młodych, 14-dniowych zwierząt o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II), poziom zawartości miedzi w nerkach nie różnił się w porównaniu do osobników z grupy kontrolnej (Wyk. 8). Otrzymany wynik świadczy o braku zaburzeń w procesie reabsorpcji miedzi z moczu pierwotnego przez komórki kanalików nerkowych, pomimo dodatkowej ilości miedzi pochodzącej z iniekcji CuCl_2 . Przedstawione w obecnej pracy wyniki wskazują również, że u 14-dniowych samców o genotypie dzikim, u których białko ATP7A działa prawidłowo, nadmiar miedzi został w głównej mierze zmagazynowany w obrębie komórek wątroby. U samców o genotypie dzikim miedź nie jest zatrzymywana w komórkach kanalików nerkowych. Jednak wyniki przeprowadzonych wcześniej doświadczeń wskazują, że podawanie chlorku miedzi (II) w pierwszym tygodniu życia myszy nie pozostaje bez wpływu na rozwój nerki. U 14-dniowych samców o genotypie dzikim poddanych

suplementacji chlorkiem miedzi (II) nie stwierdzono zaburzeń struktury kłębuszków ani kanalików nerkowych, jednak stwierdzono, że liczba kłębuszków nerkowych była u tych zwierząt znacznie mniejsza w porównaniu do osobników kontrolnych. U 14-dniowych samców poddanych suplementacji zaobserwowano również zmiany w obrębie struktury rdzenia nerki polegające na rozluźnieniu jego struktury oraz występowania nadmiaru tkanki interstycjalnej (Lenartowicz 2011).

8. 4. 1. 2. Analiza zawartości miedzi w nerkach mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) niepoddanych terapii CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Wyniki analizy zawartości miedzi w nerkach 14-dniowych samców mutantów *mosaic* wykazały, że u samców, które nie były poddane terapii chlorkiem miedzi (II) poziom miedzi w nerkach jest 3-krotnie wyższy niż u osobników kontrolnych (Wyk. 8). Podobne do przedstawionych w obecnej pracy wyniki otrzymano w przypadku 11-dniowych mutantów *brindled*, u których poziom zawartości miedzi w nerkach jest wyższy w porównaniu do osobników kontrolnych (Camakaris 1979). Wzrost zawartości miedzi w nerkach stwierdzono również u 7-dniowych samców *macular*, *brindled* i *blotchy* (Nakagawa i wsp. 1993, Philips i wsp. 1991, Shiraishi i wsp. 1988), u 13-dniowych mutantów *brindled* i *blotchy* (Philips i wsp. 1986, Prohaska 1983), a także u 14-dniowych samców mutantów *macular* (Murata i wsp. 1997). Obserwowane u mutantów *mosaic* oraz u innych mutantów z grupy *mottled* zjawisko akumulacji miedzi w nerkach związane jest z zaburzonym procesem reabsorpcji miedzi z moczu pierwotnego, co u tych zwierząt wywołane jest brakiem aktywności białka ATP7A. Gromadzenie dużych ilości miedzi w obrębie nerek u samców mutantów *mosaic* zaczyna się już w okresie życia prenatalnego, co potwierdzają wyniki badań poziomu zawartości miedzi, które przeprowadzono w nerkach osesków, od których pobrano nerki w pierwszej dobie życia (Lenartowicz i wsp. 2011). Gromadzenie miedzi w nerkach myszy mutantów prowadzi do silnego uszkodzenia tego organu. U myszy tych miedź zakumulowana jest w obrębie komórek kanalików nerkowych, natomiast nie jest dostarczana do innych, kluczowych organów, a samce takie cierpią na ogólnoustrojowy niedobór tego pierwiastka (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010a, Migdał i Juszczuk 1975, Radochońska 1970). Badania z wykorzystaniem nerek pochodzących od 14-dniowych samców *mosaic* wykazały, że do akumulacji miedzi dochodzi głównie w obrębie kory nerki, a dokładnie w komórkach kanalików nerkowych (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001). U 14-dniowych mutantów *mosaic* toksyczne ilości miedzi, które znajdują się w nerkach wpływają negatywnie na strukturę oraz funkcję tego

organu. W obrębie kory nerki mutantów obserwowano występowanie licznych lezji oraz kanalików nerkowych z poszerzonym światłem i uszkodzeniem nabłonka. Obserwowano również atroficzne kłębuszki nerkowe oraz patologiczne zmiany w budowie torebki Bowmana (słabo zaznaczona przestrzeń moczowa) (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz 2011). Również u innych mutantów z grupy *mottled* (*brindled* oraz *macular*) miedź akumulowana jest głównie w obrębie kory nerki (Kodama 1993, Yoshimura 1994). Zakumulowana w obrębie komórek kanalików nerkowych miedź najprawdopodobniej związana jest w kompleksie z metalotioneiną oraz w pęcherzykach cytoplazmatycznych (późne endosomy oraz lizosomy), na co wskazują badania przeprowadzone na mutantach *brindled* (Suzuki-Kurasaki i wsp. 1997) oraz na linii komórkowej HEK-293T (linia komórek pochodzących z nerki płodu ludzkiego), linii komórkowej HeLa (linia komórek raka szyjki macicy) oraz na mysich fibroblastach (Miyayama i wsp. 2009, Van den Berghe i wsp. 2007).

U samców mutantów miedź, która jest dostarczana do nerek pochodzi najprawdopodobniej jedynie z wątroby, gdzie niewielka ilość tego pierwiastka została zmagazynowana już w okresie życia płodowego. Jest ona następnie wykorzystywana w procesach metabolicznych przebiegających na wczesnych etapach życia postnatalnego. U młodych samców mutantów *mosaic* niedobór miedzi nie może być uzupełniany poprzez wchłanianie tego pierwiastka wraz z mlekiem matki, gdyż brak aktywności białka ATP7A uniemożliwia transport jonów tego pierwiastka z enterocytów do krwioobiegu (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010a, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2017, Styrna 1977).

8. 4. 1. 3. Analiza zawartości miedzi w nerkach mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Wyniki przedstawione w obecnej pracy wskazują, że poziom zawartości miedzi w nerkach mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 jest aż 12-krotnie wyższy w porównaniu do grupy osobników kontrolnych oraz 4-krotnie wyższy w porównaniu do mutantów *mosaic* niepoddanych takiej terapii (Wyk. 8). Otrzymane wyniki jeszcze raz potwierdzają, że w przypadku tej grupy zwierząt w wyniku braku aktywności białka ATP7A procesy reabsorpcji miedzi z moczu pierwotnego są zaburzone (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010a, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2017, Styrna 1977). Wzrost poziomu zawartości miedzi w nerkach obserwowano

również u mutantów *brindled* (Hunt 1976) oraz *macular* (Bhadhprasit i wsp. 2012, Kodama i wsp. 2005), u których prowadzono terapię chlorkiem miedzi (II).

U samców mutantów cierpiących na ogólnoustrojowy niedobór miedzi proces reabsorpcji miedzi z moczu pierwotnego najprawdopodobniej jest nasilony, o czym może świadczyć wzrost zawartości miedzi w nerkach tych zwierząt. Miedź, która dostaje się do wnętrza kanalików nerkowych nie może zostać uwolniona do krwioobiegu i zostaje zmagazynowana najprawdopodobniej poprzez związanie w kompleksach cytoplazmatycznych z metalotioneiną oraz w obrębie pęcherzyków cytoplazmatycznych (Miyayama i wsp. 2009, Van den Berghe i wsp. 2007). U tych samców tylko niewielka ilość miedzi transportowana jest do wątroby, co potwierdzają wyniki wskazujące na znacznie niższą zawartość tego pierwiastka w wątrobie w porównaniu do zwierząt o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (Wyk. 5).

Przeprowadzone analizy histologiczne wskazują, że u 14-dniowych samców mutantów *mosaic* występują zmiany w obrębie struktury nerek. Obserwowano u nich uszkodzenie kłębuszków nerkowych, liczne i rozległe lezje, zniekształcone kanaliki nerkowe oraz komórki nabłonkowe kanalików nerkowych z silnie powiększonym jądrem (kariomegalia). W rdzeniu nerek u tej grupy mutantów obserwowano nadmiar tkanki interstycjalnej (Lenartowicz 2011). U mutantów *mosaic* akumulacja miedzi w nerkach prowadzi nie tylko do uszkodzenia tego organu, ale równocześnie uniemożliwia dostarczenie jonów miedzi do pozostałych organów, takich jak mózg czy wątroba (Lenartowicz i wsp. 2011). Podobny problem akumulacji miedzi w nerkach zaobserwowano u pacjentów z chorobą Menkesa (Horn i wsp. 2019, Kim i wsp. 2019, Zaffanello i wsp. 2006). Stwierdzono, że u chorych, pomimo akumulacji miedzi w nerkach, poziom tego pierwiastka w moczu jest podobny lub niższy niż u ludzi zdrowych (Horn i wsp. 2019). Wyniki te wskazują, że podobnie jak u myszy mutantów *mottled*, podana pacjentom terapeutycznie miedź jest wychwytywana w komórkach kanalików nerkowych.

8. 4. 2. Analiza zawartości miedzi w nerkach osobników 46-dniowych

Przeprowadzone analizy zawartości miedzi w nerkach myszy 46-dniowych miały na celu sprawdzenie czy podawanie chlorku miedzi (II) przez okres 44 dni w regularnych, 2-dniowych odstępach, ma wpływ na zawartość tego pierwiastka w badanym organie.

8. 4. 2. 1. Analiza zawartości miedzi w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 46-dniowe

Analiza zawartości miedzi w nerkach wykonana u myszy 46-dniowych o genotypie dzikim pozwoliła stwierdzić, czy długotrwałe podawanie chlorku miedzi (II) w terapeutycznych dawkach wpływa na podniesienie zawartości tego pierwiastka w badanym organie. Otrzymane wyniki wskazują, że u zwierząt tej grupy poziom zawartości miedzi w nerkach nie różni się statystycznie od tego u osobników kontrolnych (Wyk. 9), co sugeruje, że długotrwałe podawanie iniekcji chlorku miedzi (II) w regularnych odstępach czasu przez okres pierwszych 44 dni nie wpływa na zmiany zawartości miedzi w nerkach tych zwierząt. Otrzymane wyniki świadczą o tym, że u zwierząt, u których białko ATP7A jest aktywne procesy reabsorpcji miedzi z moczu, a następnie transportu tego pierwiastka do krwioobiegu zachodzą w sposób prawidłowy, pomimo dodatkowych ilości miedzi dostarczanych do organizmu. Bardzo ważnym spostrzeżeniem jest, że u zwierząt o genotypie dzikim otrzymujących suplementację chlorkiem miedzi (II) zawartość miedzi w wątrobie nie jest wyższa niż u grupy kontrolnej, co wskazuje, że nadmiar miedzi jest najprawdopodobniej usuwany z organizmu (Wyk. 6). Wyniki te świadczą o tym, że pomimo dodatkowej ilości miedzi dostarczanej do organizmu w postaci iniekcji CuCl_2 , w nerkach myszy o genotypie dzikim regulacja poziomu tego pierwiastka prowadzi do utrzymania pełnej homeostazy miedzi.

Bardzo cennym i jednocześnie uzupełniającym powyższe hipotezy będzie przeprowadzenie analiz zawartości miedzi w kale oraz moczu zwierząt tej grupy badanej. Analizy takie pozwoliłyby odpowiedzieć na pytanie, na jakiej drodze usuwany jest nadmiar tego pierwiastka z organizmu samców o genotypie dzikim poddawanych suplementacji chlorkiem miedzi (II).

8. 4. 2. 2. Analiza zawartości miedzi w nerkach mutantów *mosaic* ($\text{Atp7a}^{\text{mo-ms}}$) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 46-dniowe

Przeprowadzone w obecnej pracy badania po raz pierwszy wykazały, jak wysoki poziom akumulacji miedzi w nerkach osiągają mutanty w momencie zakończenia trwającej 44 dni terapii. Podawana dodatkowa ilość miedzi zostaje dostarczona wraz z krwią do wszystkich tkanek organizmu w tym również do nerek. W nerkach krew zostaje poddana filtracji kłębuszkowej, dzięki czemu miedź przedostaje się do moczu pierwotnego, skąd następnie przy udziale białka Ctr1 zostaje zreabsorbowana do wnętrza komórek nabłonkowych kanalików nerkowych (Wijmenga i Klomp 2004). Wyniki przeprowadzonych

analiz wykazały, że poziom miedzi w nerkach 46-dniowych samców mutantów poddanych terapii CuCl_2 wzrósł około 12-krotnie w porównaniu do osobników kontrolnych oraz 11-krotnie w porównaniu do osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (Wyk. 9).

Zniesienie efektu letalnego po zastosowaniu terapii polegającej na podaniu związków miedzi z pominięciem bariery jelitowej obserwowano również w przypadku innych mutacji z grupy *mottled* (Bhadhprasit i wsp. 2012, Kodama i wsp. 2005). Jednak dotychczas istnieje bardzo niewiele danych dotyczących zawartości miedzi w nerkach mutantów *mottled* w wieku około 2 miesięcy. Znaczny wzrost miedzi w nerkach stwierdzono u 2 miesięcznych mutantów *brindled*, które otrzymały pojedynczą iniekcję chlorku miedzi (II) w 7 dniu życia (Mann i wsp. 1979). Badania przeprowadzone przez H. Kodama i współpracowników na 60-dniowych mutantach *macular* wykazały akumulację tego pierwiastka w nerkach mutantów poddanych wcześniej terapii (Kodama i wsp. 1993). Otrzymane przez nich wyniki wykazały jednak tylko 2,5-krotny wzrost zawartości miedzi w nerkach mutantów, jednak sposób prowadzenia terapii przez grupę H. Kodamy różnił się znacznie od przedstawionego w obecnej pracy. Myszy *macular* poddane były terapii polegającej na 2-krotnym, podskórnym podaniu chlorku miedzi (II) w 7 i 10 dniu życia, dlatego też zawartość miedzi w nerkach była u nich znacznie niższa niż u 46-dniowych mutantów *mosic* (Kodama i wsp. 1993). U mutantów *macular* stwierdzono również znaczną depozycję miedzi w obrębie ściany jelita cienkiego. Zakumulowana miedź pochodziła z pokarmu, jednak brak aktywności białka ATP7A uniemożliwił transport tego pierwiastka z enterocytów do krwiobiegu (Kodama i wsp. 1993). Również u badanych 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 miedź dostarczana jest do organizmu wraz z pokarmem, oraz w postaci iniekcji chlorkiem miedzi (II). Prawdopodobnie u mutantów *mosaic* miedź, która pochodzi z pokarmu również pozostaje uwięziona w ścianach jelita cienkiego tych zwierząt, co związane jest z brakiem prawidłowo funkcjonującego białka ATP7A w enterocytach. Tym samym uwięziony w komórkach jelita pierwiastek nie może zostać wykorzystany przez pozostałe tkanki organizmu, a samce mutanty wykorzystują tylko miedź pochodzącą z iniekcji CuCl_2 .

Przedstawione w obecnej pracy wyniki świadczą o tym, że podanie chlorku miedzi (II) z pominięciem bariery jelitowej u 46-dniowych mutantów *mosaic* znosi letalne efekty mutacji, ale skutkuje znacznym wzrostem poziomu zawartości miedzi w nerkach tych zwierząt.

8. 4. 3. Analiza zawartości miedzi w nerkach osobników 6 miesięcznych

Wykorzystanie do analiz nerek pochodzących od myszy 6 miesięcznych o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic*, które w ciągu pierwszych 44 dni życia otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II), miało na celu sprawdzenie długotrwałego działania suplementacji CuCl_2 na poziom zawartości miedzi w nerkach badanych zwierząt.

8. 4. 3. 1. Analiza zawartości miedzi w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 6 miesięczne

U zwierząt 6 miesięcznych po podaniu ostatniej iniekcji chlorku miedzi (II), która miała miejsce w 44 dniu życia, nastąpił okres bez stosowania suplementacji tym związkiem, a jedynym źródłem miedzi dostarczanej do organizmu tych zwierząt był pokarm. Poziom zawartości miedzi w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 nie wykazywał statystycznie istotnych różnic w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 10).

Przedstawione w obecnej pracy wyniki wykazały, że u 6 miesięcznych zwierząt o genotypie dzikim, poddanych suplementacji CuCl_2 , procesy mające na celu utrzymanie prawidłowej homeostazy miedzi w nerkach działają w sposób prawidłowy, gdyż u tych myszy z prawidłowo funkcjonującym białkiem ATP7A, zachodził proces reabsorpcji miedzi z moczu do krwioobiegu. Jednak przeprowadzone analizy histologiczne nerek pochodzących od 6 miesięcznych myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 wykazały zmiany w strukturze tego organu. Ogólna budowa nerek nie była znacząco zmieniona, jednak w obrębie proksymalnych odcinków kanalików nerkowych, w niektórych nefronach, pojawiły się zwakuolizowane, czy też proliferujące komórki, a także nieliczne zmiany nekrotyczne. Pomimo iż zawartość miedzi w nerkach badanych osobników jest porównywalna do tej, jaka jest u zwierząt kontrolnych, to obserwowane zmiany w obrębie nerek świadczą o wpływie stosowanej na wczesnych etapach życia suplementacji CuCl_2 na strukturę tego organu (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz 2011).

8. 4. 3. 2. Analiza zawartości miedzi w nerkach mutantów *mosaic* ($\text{Atp7a}^{\text{mo-ms}}$) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 6 miesięczne

Jedynym źródłem miedzi u 6 miesięcznych mutantów *mosaic* jest pokarm, jednak obniżona zawartość miedzi w osoczu i wątrobie pozwala przypuszczać, że dochodzi u tych zwierząt do akumulacji badanego pierwiastka w ścianie jelita cienkiego (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2017). Pomimo, że u 6 miesięcznych

mutantów *mosaic* ostatnia dawka CuCl_2 została podana około 4,5-miesiąca wcześniej, to przeprowadzone analizy zawartości miedzi w nerkach tych myszy wykazały wysoki wzrost zawartości tego pierwiastka w porównaniu do osobników o genotypie dzikim zarówno niepoddanych, jak i poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) (Wyk. 10). 6 miesięczne mutanty *mosaic* wykazują ogólnoustrojowy niedobór miedzi, a niższą zawartość tego pierwiastka w porównaniu z grupą kontrolną stwierdzono w wątrobie oraz osoczu (Lenartowicz i wsp. 2017). Wyniki te świadczą o tym, że brak prawidłowo funkcjonującego białka ATP7A prowadzi do zaburzenia procesów reabsorpcji miedzi z moczu do krwioobiegu. Ponadto wysoki poziom miedzi w nerkach tych osobników ma silnie negatywny wpływ zarówno na strukturę, jak i funkcję tego organu, o czym świadczą liczne uszkodzenia, które zostały zaobserwowane w trakcie analiz histologicznych. U tych zwierząt obserwuje się patologiczne zmiany w obrębie struktury nerek, które wpływają negatywnie również na prawidłową funkcję tego organu. Zmiany te związane są z występowaniem licznych lezji w obrębie kory nerki, zwłóknieniu tkanki łącznej oraz występowanie licznych nacieków limfocytarnych, które świadczą o toczącym się stanie zapalnym. Uszkodzeniu ulegają również struktury nefronu. Otóż kłębuszki nerkowe były w dużej mierze atroficzne i zdegenerowane, a przestrzeń moczowa znacznie powiększona. Torebki Bowmana w niektórych ciałkach nerkowych wykazywały cechy zwłóknienia. W największej mierze uszkodzenia dotyczyły jednak kanalików nerkowych. Obserwowano powiększenie ich średnicy, jak również liczne zmiany nekrotyczne w obrębie nabłonka wyściełającego kanaliki nerkowe. W wielu komórkach nabłonkowych wyściełających kanaliki obserwowano kariomegalię. Zjawisko to jest charakterystyczne dla toksycznego działania metali ciężkich na komórki. Stwierdzono również, że w wypełnionych płynem cystach zlokalizowanych w obrębie komórek kanalików nerkowych dochodzi do proliferacji atypowych komórek, które tworzą tam kolonie, co może być początkiem procesów nowotworowych. W nerkach tych osobników zaobserwowano również kłębuszki o prawidłowej strukturze, co umożliwia funkcjonowanie nerek (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz 2011).

8. 5. Analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na ekspresję genu i białka Ctr1/CTR1, a także komórkową lokalizację białka CTR1 w nerkach

Zredukowane jony miedzi są pobierane przez komórkę przy udziale białek z rodziny CTR. Wyniki przeprowadzonych analiz wykazały, że aż 80% miedzi transportowane jest do wnętrza komórek ssaków przy udziale białka CTR1 (Larson i wsp. 2010). Białko to jest oligomerem, które w swej aktywnej formie homotrimeru zlokalizowane jest w obrębie błony

komórkowej (Ohrvik i Thiele 2015). Homotrimer CTR1 tworzy w błonie komórkowej charakterystyczną strukturę kanału, przez który transportowane są jony miedzi z środowiska zewnętrznego, do cytoplazmy komórkowej, a proces ten nie wymaga nakładu energii pochodzącej z hydrolizy cząsteczek ATP (Aller i wsp. 2004, Aller i Unger 2006, De Feo i wsp. 2007, De Feo i wsp. 2009). Białko Ctr1, ze względu na pełnione funkcje transportera, jest zlokalizowane głównie w błonie komórkowej (Kim i wsp. 2009, Wijmenga i Klomp 2004). Co więcej, w komórkach spolaryzowanych białko to umiejscowione jest głównie w błonie apikalnej (Bauerly i wsp. 2004, Kuo i wsp. 2006, Nose i wsp. 2006, Nose i wsp. 2010). Jednak wyniki analiz przeprowadzonych na modelu linii spolaryzowanych komórek epitelialnych Caco2 oraz w obrębie komórek jelita czy łożyska myszy wykazały, że białko to może również przyjmować lokalizację w błonie bazalnej (Hardman i wsp. 2006, Zimnicka i wsp. 2007).

Zarówno u człowieka, jak i u myszy białko CTR1 wykazuje wysoką ekspresję w takich narządach jak wątroba, trzustka, serce, płuca, jajniki, jądra, a także nerki (Gupta i Lutsenko 2009, Kuo i wsp. 2006, Zhou i Gitschier 1997). Poziom ekspresji genu *Ctr1* regulowany jest w sposób zależy od miedzi przez czynnik transkrypcyjny SP1 (Liang i wsp. 2012, Song i wsp. 2008). Również poziom ekspresji i wewnątrzkomórkowa lokalizacja białka CTR1 jest regulowana przez stężenie jonów miedzi. Pod wpływem wysokiego stężenia jonów miedzi białko CTR1 ulega internalizacji z błony do cytoplazmy komórek, a następnie wbudowywane jest w błony wczesnych endosomów i lizosomów (Clifford i wsp. 2016). Pod wpływem dalszego wzrostu stężenia jonów miedzi, homotrimer CTR1 rozpada się na nieaktywne formy dimerów oraz monomerów, a następnie ulega procesom degradacji (Aller i Unger 2006, Bauerly i wsp. 2004, De Feo i wsp. 2009, Knight i wsp. 1996, Nose i wsp. 2006, Nose i wsp. 2010, Zimnicka i wsp. 2007). Zależna od poziomu miedzi regulacja ekspresji białka CTR1 chroni komórkę przed pobieraniem nadmiaru kationów miedziowych, a tym samym przed toksycznym działaniem wysokiego stężenia tego pierwiastka.

W obecnej pracy postanowiono sprawdzić, czy pod wpływem działania wysokiego stężenia jonów miedzi w komórkach nerek samców mutantów *mosaic* dochodzi do zmian poziomu ekspresji genu oraz białka *Ctr1*/CTR1. Przeprowadzone w obecnej pracy analizy wskazują, że u wszystkich badanych grup zwierząt występuje zarówno ekspresja genu *Ctr1* (Fot. 5, Wyk. 11-13), jak i białka CTR1 (Ryc. 5-7) w nerkach. Badano również lokalizację białka CTR1 w komórkach nerek osobników o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic* niepoddanych oraz poddanych iniekcji chlorkiem miedzi (II) komórkach nefronu.

8. 5. 1. Analiza ekspresji genu *Ctrl* oraz lokalizacji białka *CTR1* w nerkach 14-dniowych osobników

Przeprowadzone analizy w nerkach myszy 14-dniowych miały na celu sprawdzenie czy podawanie chlorku miedzi (II) w początkowym okresie życia ma wpływ na zmianę ekspresji genu oraz białka *Ctrl*/*CTR1*, a także komórkową lokalizację badanego białka u osobników młodych.

8. 5. 1. 1. Analiza ekspresji genu *Ctrl* oraz lokalizacji białka *CTR1* w nerkach osobników o genotypie dzikim nieotrzymujących suplementacji CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

W przypadku młodych, 14-dniowych myszy zapotrzebowanie na miedź jest bardzo duże, ponieważ organizm jest w okresie intensywnego wzrostu, co potwierdzają przedstawione w obecnej pracy wyniki dotyczące analizy masy ciała (Wyk. 1). U myszy 14-dniowych głównym źródłem miedzi są zapasy tego pierwiastka zmagazynowane w wątrobie w okresie życia prenatalnego, natomiast w mniejszym stopniu zapotrzebowanie na ten pierwiastek pokrywane jest poprzez pokarm, który stanowi mleko matki (Chun i wsp. 2017, Lenartowicz i wsp. 2010a, Lenartowicz i wsp. 2015a). Jednak w jelitach osesków nie są jeszcze do końca wykształcone transportery umożliwiające prawidłowe wchłanianie miedzi, dlatego też w organizmie młodych, 14-dniowych zwierząt zachodzi bardzo oszczędna gospodarka jonami miedzi (Bauerly i wsp. 2005, Lenartowicz 2011, Lenartowicz i wsp. 2011, Olivares i wsp. 2002, Van den Berghe i Klomp 2010). Białko ATP7A u myszy młodych w komórkach nabłonkowych kanalików nerkowych zlokalizowane jest głównie w błonie bazolateralnej, co świadczy o bardzo intensywnym procesie reabsorpcji tego pierwiastka do naczyń krwionośnych (Lenartowicz 2011, Lenartowicz i wsp. 2012a, Linz i wsp. 2008).

Wyniki otrzymane w obecnej pracy wykazały, że w nerkach 14-dniowych myszy zachodzi zarówno ekspresja genu *Ctrl*, jak i białka *CTR1* (Wyk. 11. Fot. 6A). Komórki nabłonkowe kanalików nerkowych należą do komórek spolaryzowanych, a ich błona apikalna zwrócona jest w stronę światła kanalika, z kolei błona bazalna jest zlokalizowana od strony, gdzie kanalik nerkowy jest otoczony naczyniami krwionośnymi. Uzyskane wyniki analiz komórkowej lokalizacji białka *CTR1* w komórkach kanalików części korowej nerki u tych zwierząt wskazują, że białko to ma ekspresję głównie w błonie bazalnej oraz w mniejszym stopniu w błonie apikalnej (Fot. 6A). Ekspresję białka *CTR1* w błonie apikalnej kanalików nerkowych stwierdzono również u 16-dniowych samców myszy o genotypie dzikim (Kuo i wsp. 2006). Taka lokalizacja białka potwierdza, że u młodych myszy zachodzi intensywne wchłanianie jonów miedzi z przesącza pierwotnego do komórek kanalików nerkowych.

Wyniki uzyskane przez Y. Kuo i współautorów nie wykazały jednak obecności białka CTR1 w błonie bazalnej kanalików nerkowych (Kuo i wsp. 2006). Przeprowadzone w obecnej pracy analizy wykazały, że białko CTR1 przyjmuje również lokalizację w obrębie błony bazalnej komórek nabłonkowych kanalików nerkowych (Fot. 6A). Różnice w lokalizacji białka CTR1 uzyskane pomiędzy zespołem badawczym Y. Kuo, a tymi przedstawionymi w obecnej pracy mogą wynikać ze sposobu analizy ekspresji badanego białka. Autorzy, którzy obserwowali tylko lokalizację w błonie apikalnej białka CTR1 używali, podobnie, jak w obecnej pracy, techniki immunolokalizacji białka w obrębie komórek, jednak reakcję prowadzili na skrawkach parafinowych, co mogło przełożyć się na mniejszą dokładność analizy przeprowadzoną przy użyciu mikroskopu świetlnego. Wyniki prezentowane w obecnej pracy zostały uzyskane w reakcji immunolokalizacji białka, prowadzonej na skrawkach mrożeniowych, a analizę wykonywano za pomocą mikroskopu konfokalnego o wysokiej rozdzielczości.

Lokalizację w błonie bazalnej błonowego transportera CTR1 stwierdzili jednak inni autorzy, którzy wykazali taką lokalizację w komórkach jelita, jak również w komórkach linii MDCK (ang. *Madin-Darby canine kidney cells*) oraz linii OK (ang. *opossum kidney*) będących modelem *in vitro* dla komórek kanalików nerkowych (Zimnicka i wsp. 2007). Autorzy ci nie obserwowali jednak apikalnej lokalizacji białka CTR1 w komórkach linii MDCK oraz OK. Różnice w obserwacji prowadzonej przez te dwa zespoły mogły wynikać również z tego, że w badaniach użyto linii komórkowych nie zaś skrawków pochodzących z nerek.

Obecność białka CTR1 w błonie bazalnej kanalików nerkowych może sugerować, że zachodzi absorpcja jonów miedzi przez te komórki z naczyń krwionośnych, a pobrane jony miedzi mogą być wykorzystane na potrzeby metaboliczne komórek. Podobną sugestię wysunęli również inni autorzy (Hardman i wsp. 2006, Zimnicka i wsp. 2007). Komórki kanalików nerkowych charakteryzują się bardzo wysokim tempem metabolizmu, gdyż nerka jest odpowiedzialna za oczyszczanie krwi ze szkodliwych produktów przemiany materii. Oprócz tego uczestniczy w utrzymaniu prawidłowej gospodarki wodno-elektrolitowej, a także pomaga regulować ciśnienie krwi. W komórkach kanalików nerkowych zachodzi zatem szereg procesów, w których wykorzystywanych jest wiele enzymów, również tych zależnych od miedzi, do których zalicza się przede wszystkim oksydazę cytochromu c biorącą udział w procesie oddychania komórkowego (Beers i wsp. 1997, Glerum i wsp. 1996, Maxfield i wsp. 2004), czy też chroniącą przed szkodliwym działaniem wolnych rodników, dysmutazę ponadtlenkową SOD1 (Casareno i wsp. 1998, Cobine i wsp. 2006, Culotta i wsp. 1997, Rae i

wsp. 1999). Tym samym komórki te muszą mieć zapewniony stały dostęp tego pierwiastka. Pobieranie miedzi przez błonę zarówno apikalną, jak i bazalną komórek kanalików nerkowych u 14-dniowych myszy o genotypie dzikim zapewnia dostarczanie stałego dopływu tego pierwiastka, który jest niezbędny dla prawidłowego metabolizmu komórek kanalików nerkowych.

Przeprowadzone w obecnej pracy analizy kolokalizacji białek CTR1 oraz AQP1 wykazały, że u 14-dniowych osobników o genotypie dzikim białko CTR1 zlokalizowane jest głównie w komórkach kanalików proksymalnych (Fot. 9A). Wyniki te mogą sugerować, że procesy najintensywniejszej absorpcji miedzi z moczu pierwotnego zachodzą w początkowych odcinkach proksymalnych kanalików nerkowych.

W obecnej pracy po raz pierwszy wykazano ekspresję białka CTR1 w obrębie rdzenia nerki. Białko to zlokalizowane było w komórkach nabłonkowych pętli Henlego. Jego ekspresję wykryto w błonie apikalnej tych komórek, co również może wskazywać, że w tej części nefronu zachodzi absorpcja miedzi z moczu do komórek nabłonka (Fot. 7A). Jak wykazały wcześniejsze badania w komórkach tych nie zachodzi ekspresja białka ATP7A (M. Lenartowicz – informacja ustna), co wskazuje, że miedź zaabsorbowana przy udziale białka CTR1 wykorzystywana jest na potrzeby metaboliczne tych komórek. Uzyskane wyniki potwierdzają raz jeszcze oszczędną gospodarkę miedzią występującą u myszy młodych.

Wykonane analizy ekspresji białka CTR1 przeprowadzono przy użyciu metody Western blot, wykazały, że w nerkach 14-dniowych osobników o genotypie dzikim badane białko występuje również w aktywnej formie homotrimeru, co jeszcze raz potwierdza, że w komórkach nerek procesy transportu jonów miedzi zachodzą przy udziale białka CTR1 (Ryc.5).

8. 5. 1. 2. Analiza ekspresji genu *Ctrl* oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

U myszy o genotypie dzikim, które otrzymywały suplementację chlorku miedzi (II) lokalizację badanego białka w obrębie kory nerki obserwowano w błonie apikalnej, a także w cytoplazmie komórek kanalików nerkowych (Fot. 6B). Przeprowadzone analizy kolokalizacji białek CTR1 oraz AQP1 wykazały, że u 14-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II), podobnie jak u myszy kontrolnych, białko CTR1 wykazywało ekspresję w obrębie komórek kanalików proksymalnych nerki (Fot. 9B). Wewnątrzkomórkowa lokalizacja białka CTR1 różni się od tej, którą obserwuje się w kanalikach nerkowych 14-dniowych myszy o genotypie dzikim nieotrzymujących

suplementacji CuCl_2 (zwierzęta z grupy kontrolnej), u których białko to przyjmowało lokalizację błonową (Fot. 6A). Inny wzór lokalizacji białka CTR1 w komórkach nerki obserwowany u myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (Fot. 6B) można wiązać z podniesieniem stężenia jonów miedzi w moczu pierwotnym w wyniku dostarczenia dodatkowej porcji miedzi do organizmu zwierząt w postaci iniekcji. Należy przypuszczać, że chlorek miedzi (II) podany w postaci iniekcji z pominięciem bariery jelitowej został wchłonięty przez płyny ustrojowe i przedostał się do krwioobiegu. Wraz z krwią miedź transportowana była do wszystkich organów. Większość tego pierwiastka została zdeponowana w wątrobie (Wyk. 5.), jednak jony miedzi trafiają również do nerek, gdzie podlegają procesowi filtracji, przez co może wzrastać stężenie tego pierwiastka w moczu pierwotnym. W nerkach tych myszy zachodzi proces absorpcji miedzi przy udziale białka CTR1, o czym świadczy obecność tego białka w błonie apikalnej komórek kanalików nerkowych. Równocześnie wysokie stężenie jonów miedzi w moczu pierwotnym u tych zwierząt indukowało relokację białka do cytoplazmy komórek nabłonkowych kanalików. Jak wykazały wyniki licznych analiz przeprowadzonych na liniach komórkowych, wysokie stężenie miedzi wpływa na zmianę wewnątrzkomórkowej lokalizacji białka CTR1. Pod wpływem wysokiego stężenia jonów miedzi białko CTR1 z błony komórkowej transportowane jest do cytoplazmy, co ogranicza pobieranie jonów miedzi przez komórki (Clifford i wsp. 2016, Guo i wsp. 2004, Liang i wsp. 2012, Molloy i Kaplan 2009, Ooi i wsp. 1996, Petris i wsp. 2003). Prawdopodobnie cytoplazmatyczna lokalizacja białka CTR1 w komórkach kanalików nerkowych pochodzących od młodych, 14-dniowych myszy o genotypie dzikim, które poddane były suplementacji chlorkiem miedzi (II), związana jest z wspomnianymi procesami internalizacji badanego białka do cytoplazmy, pod wpływem działania wysokiego stężenia miedzi w moczu pierwotnym. Procesy te możemy nazwać mechanizmem kompensacyjnym chroniącym komórkę przed toksycznym działaniem wysokiego stężenia jonów miedzi. Podobny mechanizm obserwowano w wątrobie myszy knockoutów z wyłączonym genem *Atp7b*, które są zwierzęcym modelem choroby Wilsona. U myszy tych miedź magazynowana jest w komórkach wątroby aż do poziomu toksycznego (Buiakova i wsp. 1999, Lutsenko 2008). U myszy *Atp7b*^{-/-} poziom miedzi w wątrobie wzrasta wraz z wiekiem aż do około 20 tygodnia życia. W 20 tygodniu życia poziom miedzi w wątrobie myszy knockoutów był około 40 razy wyższy niż u myszy kontrolnych. Następnie stwierdzono, że zawartość badanego pierwiastka u myszy starszych niż 20 tygodni ulega stopniowemu obniżeniu (Huster i wsp. 2006). U myszy *Atp7b*^{-/-} nadmiar tego pierwiastka gromadzony jest w hepatocytach, w których pobieranie jonów miedzi zachodzi za

pośrednictwem białka CTR1. Obniżenie zawartości miedzi w wątrobie myszy knockoutów nastąpiło na skutek obniżenia poziomu ekspresji białka CTR1 i zmiany lokalizacji tego białka w komórkach hepatocytów. Wykazano bowiem, że u myszy tych następuje relokalizacja białka CTR1 z błony komórkowej hepatocytów do cytoplazmy (Ralle i wsp. 2010).

U myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) białko CTR1 zlokalizowano zarówno w obrębie komórek kory, jak i rdzenia nerki. Również w obrębie rdzenia nerki ekspresję białka CTR1 stwierdzono w cytoplazmie komórek pętli Henlego (Fot. 7B), co może wskazywać, że komórki te również chronione są przed nefrotoksycznym działaniem nadmiaru tego pierwiastka.

Analizując poziom ekspresji białka CTR1 metodą Western blot w nerkach badanych myszy młodych zaobserwowano, że suplementacja chlorkiem miedzi (II) powoduje spadek ekspresji białka CTR1 w nerkach myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 w porównaniu do grupy kontrolnej (Ryc. 5) (należy zaznaczyć, że badając ekspresję białka CTR1 metodą Western blot analizowano prążek o masie około 75 kDa, który odpowiada formie aktywnej homotrimeru białka CTR1). Obniżony poziom ekspresji białka CTR1 w formie trimery potwiera proces relokalizacji białka CTR1 z błony komórkowej do cytoplazmy (Ryc. 5), gdyż po relokalizacji do cytoplazmy białko CTR1 rozpada się na nieaktywne formy dimerów oraz monomerów (Aller i Unger 2006, De Feo i wsp. 2009, Nose i wsp. 2006).

W obecnej pracy analizowano również ekspresję genu *Ctr1* u myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 i stwierdzono, że była ona znacznie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej (Wyk. 11). Wiadomo bowiem, że pod wpływem wzrostu stężenia jonów miedzi wzrasta również ekspresja genu *Ctr1*. Potwierdzają to analizy *in vitro* przeprowadzone na ludzkiej linii komórek śródbłonna żyły pępkowej HUVEC (ang. *human umbilical vein endothelial cells*), w których po dodaniu miedzi do pożywki hodowlanej następował wzrost ekspresji genu *Ctr1* (Narayanan i wsp. 2013). W badaniach przeprowadzonych *in vivo* na myszach z knockoutem genów metalotioneiny oraz genu kodującego białko ATOX1, u których występował wzrost zawartości miedzi w badanych organach, wykazano również wzrost ekspresji genu *Ctr1* (Miyayama i wsp. 2009). Przedstawione w obecnej pracy wyniki mogą sugerować, że obserwowany wzrost poziomu ekspresji genu *Ctr1* w nerkach 14-dniowych myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 najprawdopodobniej wywołany jest przez nasilony transport jonów miedzi w obrębie komórek kanalików nerkowych z moczu pierwotnego do krwioobiegu. Należy również dodać, że u myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 w

nerkach występuje funkcjonalne białko ATP7A, które umożliwia transport jonów miedzi z komórek kanalików nerkowych do otaczających je naczyń krwionośnych. Jak wykazały wyniki wcześniejszych badań, u 14-dniowych myszy suplementowanych chlorkiem miedzi (II) białko ATP7A przyjmowało lokalizację w błonie bazalnej komórek kanalików nerkowych (Lenartowicz i wsp. 2012a). Taka lokalizacja białka ATP7A wskazuje, że u myszy tych zachodzi proces transportu jonów miedzi do krwioobiegu. Aktywny transport jonów miedzi za pomocą białka ATP7A pozwala na utrzymanie stałego poziomu miedzi w komórkach nerek u tych myszy. Jak stwierdzono we wcześniejszych rozdziałach, analiza zawartości miedzi w nerkach u myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) wykazała, że poziom tego pierwiastka jest podobny jak u myszy kontrolnych.

8. 5. 1. 3. Analiza ekspresji genu *Ctr1* oraz lokalizacji białka *CTR1* w nerkach mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) niepoddanych terapii CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

U 14-dniowych mutantów *mosaic* poziom miedzi w nerkach jest 3-krotnie wyższy w porównaniu do osobników o genotypie dzikim (Wyk. 8). Akumulacja miedzi w nerkach mutantów spowodowana jest brakiem aktywności białka ATP7A, która prowadzi do zaburzeń w transporcie tego pierwiastka w komórkach kanalików nerkowych (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2012a, Lenartowicz i wsp. 2017). Przeprowadzone analizy lokalizacji białka CTR1 w nerkach pochodzących od 14-dniowych mutantów *mosaic* wykazały, że badane białko znajduje się zarówno w błonie apikalnej, jak i bazalnej komórek kanalików części korowej nerki, co wskazuje, że u mutantów *mosaic* jony miedzi absorbowane są z moczu pierwotnego przy udziale białka CTR1, a także z naczyń krwionośnych otaczających kanaliki nerkowe. Obraz ten jest bardzo podobny do tego obserwowanego w przypadku myszy 14-dniowych o genotypie dzikim, jednak w przypadku nerek mutantów *mosaic* białko CTR1 wykazuje silniejszą ekspresję w błonie apikalnej w porównaniu do osobników kontrolnych (Fot. 6C). Należy wspomnieć, że u mutantów *mosaic*, pomimo gromadzenia miedzi w nerkach, występuje ogólnoustrojowy niedobór tego pierwiastka, co może wpływać na nasilenie procesów jego absorpcji przez białko CTR1 zlokalizowane w błonie apikalnej komórek kanalików nerkowych. Zaabsorbowana miedź z powodu braku aktywności białka ATP7A zostaje jednak uwięziona w komórkach kanalików nerkowych. U mutantów *mosaic*, podobnie, jak u myszy o genotypie dzikim, u których niedobór miedzi wywołany był poprzez brak pierwiastka w diecie, następuje wzrost ekspresji białka CTR1 w błonie apikalnej komórek kanalików nerkowych (Kuo i wsp. 2006, Nose i wsp. 2010).

Przeprowadzone analizy kolokalizacji białek CTR1 oraz AQP1 wykazały, że u 14-dniowych samców mutantów *mosaic* białko CTR1 wykazuje ekspresję w początkowych odcinkach kanalików proksymalnych (Fot. 9C). Wyniki te świadczą o nasilonych procesach absorpcji jonów miedzi z moczu pierwotnego w obrębie początkowych odcinków kanalików nerkowych, dlatego też u myszy z mutacją w genie *Atp7a* stwierdzono wysoką akumulację miedzi w obrębie kory nerki (Kowal i wsp. 2010, Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz 2011). Potwierdzają to badania przeprowadzone przez N. Yoshimurę i współpracowników, którzy wykazali wysoką akumulację miedzi w obrębie komórek kanalików proksymalnych u 7-dniowych oraz 13-dniowych mutantach *brindled* (Yoshimura 1994). Jony miedzi zakumulowane w komórkach kanalików nerkowych wiązane są najprawdopodobniej przez białko metalotioneinę, a także w obrębie cytoplazmatycznych pęcherzyków, co pozwala na zahamowanie toksycznego działania tego pierwiastka na komórki nabłonkowe kanalików (Di Donato i Sarkar 1997, Hellman i wsp. 2002, Miyayama i wsp. 2009, Wijmenga i Klomp, 2004).

Ekspresję białka CTR1 stwierdzono również w błonie bazalnej komórek pętli Henlego, natomiast ekspresja badanego białka w błonie apikalnej tych komórek była niska (Fot. 7C). Niska ekspresja białka CTR1 w błonie apikalnej komórek rdzennej części kanalików nerkowych może wynikać z faktu, że u młodych samców mutantów *mosaic* mocz, który dociera kanalikami nerkowymi do części rdzennej jest ubogi w miedź, dlatego że pierwiastek ten został zreabsorbowany z moczu pierwotnego w dużej mierze już w początkowej części kanalików nerkowych, gdzie procesy te są nasilone. Wyraźna bazalna ekspresja białka CTR1 w komórkach pętli Henlego sugeruje, że w komórkach tych następuje pobieranie jonów miedzi z krwioobiegu.

Ilościowa analiza ekspresji białka CTR1 przeprowadzona metodą Western blot wykazała, że u mutantów *mosaic* poziom ekspresji badanego białka był porównywalny do tego obserwowanego u osobników kontrolnych (Ryc. 5). Podobnie, jak w przypadku samców o genotypie dzikim analizowano tylko ekspresję aktywnej formy homotrimeru CTR1. Brak różnic w ekspresji białka CTR1 pomiędzy mutantami *mosaic*, a osobnikami kontrolnymi można tłumaczyć tym, że u 14-dniowych mutantów *mosaic* aktywna forma białka CTR1 w postaci trimeru wykazuje silną ekspresję w błonie apikalnej oraz bazalnej komórek kanalików nerkowych.

W nerkach młodych, 14-dniowych mutantów *mosaic* nie odnotowano natomiast zmian w poziomie transkryptu genu *Ctr1* w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 11).

8. 5. 1. 4. Analiza ekspresji genu *Ctrl* oraz lokalizacji białka *CTR1* w nerkach mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Zawartość miedzi w nerkach u samców *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 jest wyższa zarówno w porównaniu z samcami mutantami niepoddanymi takiej terapii, jak w porównaniu do osobników kontrolnych oraz osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) (Wyk.8). Miedź dostarczana do organizmu zwierząt w postaci iniekcji wraz z krwią transportowana jest do nerek, gdzie poprzez filtrację kłębuszkową przechodzi do moczu pierwotnego, a następnie w skutek braku aktywności białka ATP7A zostaje uwięziona w obrębie nabłonkowych komórek kanalików nerkowych i nie jest powtórnie reabsorbowana do krwioobiegu. Tym samym, u samców mutantów *mosaic*, miedź podawana w postaci iniekcji CuCl_2 jest w znacznie mniejszym stopniu magazynowana w wątrobie niż u samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) (Wyk. 8).

W nerkach 14-dniowych myszy mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 jony miedzi z moczu pierwotnego są absorbowane przy udziale białka CTR1 przez komórki nabłonkowe kanalików proksymalnych, na co wskazuje silna ekspresja białka CTR1 w błonie apikalnej tych komórek (Fot. 6D). Brak aktywności białka ATP7A uniemożliwia przetransportowanie jonów miedzi przez błonę bazolateralną do krwioobiegu, dlatego też w komórkach wzrasta stężenie jonów miedzi. U mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 nie zaobserwowano bazalnej ekspresji białka CTR1 w komórkach nefronu, co może wskazywać, że komórki te nie pobierają jonów miedzi z krwioobiegu. Niska, cytoplazmatyczna ekspresja białka CTR1 w obrębie komórek kanalików nerkowych świadczy o internalizacji białka CTR1 do wnętrza komórek (Fot. 6D). Wynik ten może wskazywać, że bardzo wysokie stężenie jonów miedzi doprowadziło u nich do degradacji tego białka. Jak wykazano we wcześniejszych badaniach, bardzo wysokie stężenie miedzi prowadzi nie tylko do wewnątrzkomórkowej internalizacji białka CTR1, ale również jego degradacji (Clifford i wsp. 2016, Guo i wsp. 2004, Liang i wsp. 2012, Molloy i Kaplan 2009, Ooi i wsp. 1996, Petris i wsp. 2003).

Równocześnie przeprowadzone analizy kolokalizacji białek CTR1 oraz akwaporyny 1 wykazały, że u 14-dniowych samców mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) białko CTR1 zlokalizowane jest głównie w błonie apikalnej początkowych odcinków proksymalnych kanalików nerkowych (Fot. 9D). Wyniki te świadczą o tym, że procesy absorpcji jonów miedzi z moczu pierwotnego są nasilone w tej części kanalików nerkowych.

Silna ekspresja w błonie apikalnej komórek pętli Henlego może wskazywać, że u mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 zawartość miedzi w moczu jest wyższa niż u

mutantów *mosaic* niepoddanych terapii CuCl_2 . W komórkach pętli Henlego nie obserwowano ekspresji białka CTR1 w błonie bazalnej, co może świadczyć o tym, że u myszy tych jony miedzi nie są pobierane z naczyń krwionośnych otaczających pętle Henlego (Fot. 7D). Jednocześnie obserwowano niską ekspresję białka CTR1 w obrębie cytoplazmy komórek pętli Henlego, a wynik ten może świadczyć o zachodzących procesach internalizacji błonowego transportera do cytoplazmy, a następnie jego degradacji, pod wpływem działania wysokiego stężenia miedzi w obrębie komórek nefronu.

Używając metody Western blot wykazano, że istnieje statystyczna różnica w poziomie ekspresji białka CTR1 pomiędzy grupami samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , a samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (Ryc. 5). Ekspresja aktywnego trimery była znacznie wyższa u samców mutantów *mosaic*, co może być spowodowane bardzo silną ekspresją badanego białka w błonie apikalnej komórek zarówno części korowej, jak i rdzennej nefronu.

Przeprowadzone analizy ekspresji genu *Ctrl* w nerkach pochodzących od 14-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 nie wykazały zmian w poziomie ekspresji genu *Ctrl*.

8. 5. 2. Analiza ekspresji genu *Ctrl* oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach 46-dniowych osobników

Przeprowadzone analizy z wykorzystaniem nerek pochodzących od myszy 46-dniowych miały na celu sprawdzenie, czy podawanie chlorku miedzi (II) przez okres 44 dni w regularnych, 2-dniowych odstępach, ma wpływ na zmianę ekspresji genu oraz białka *Ctrl*/CTR1. Przy użyciu metody immunofluorescencyjnej badano również wewnątrzkomórkową lokalizację badanego białka w komórkach nefronu u poszczególnych badanych grup myszy 46-dniowych.

8. 5. 2. 1. Analiza ekspresji genu *Ctrl* oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach osobników o genotypie dzikim nieotrzymujących suplementacji CuCl_2 – osobniki 46-dniowe

W komórkach kanalików części korowej nerki 46-dniowych osobników o genotypie dzikim białko CTR1 wykazuje ekspresję w błonie apikalnej (Fot. 10A). Lokalizacja białka CTR1 w błonie apikalnej komórek kanalików nerkowych jest związana z procesem reabsorpcji jonów miedzi z moczu pierwotnego. Jony miedzi transportowane są następnie przy udziale białka ATP7A do błony bazolateralnej, gdzie na drodze egzocytozy usuwane są z komórki do naczyń krwionośnych. Z kolei w części rdzennej białko CTR1 jest zlokalizowane

głównie w błonie bazalnej komórek pętli Henlego, co może wskazywać, że w tej części nefronu jony miedzi pobierane są głównie z krwioobiegu i wykorzystywane na potrzeby metaboliczne tych komórek (Fot. 11A).

Ekspresja białka CTR1 w nerkach myszy 46-dniowych o genotypie dzikim potwierdzona była również reakcją Western blot, gdzie stwierdzono prążek odpowiadający aktywnej formie homotrimeru białka CTR1 (Ryc. 6). Obecność trimeru potwierdza, że w komórkach nerki zachodzi proces transportu jonów miedzi przy udziale białka CTR1.

Ekspresję genu *Ctr1* w nerkach tych zwierząt potwierdzono za pomocą metody real time PCR (Wyk. 12).

8. 5. 2. 2. Analiza ekspresji genu *Ctr1* oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 46-dniowe

Porównywalny poziom miedzi w nerkach 46-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) w porównaniu do grupy kontrolnej świadczy o tym, że procesy reabsorpcji miedzi z moczu pierwotnego u tych zwierząt zachodzą w sposób prawidłowy, co związane jest z aktywnym działaniem białka ATP7A w komórkach kanalików nerkowych (Wyk. 9). Wyniki analizy immunofluorescencyjnej wykazały silną ekspresję białka CTR1 w obrębie cytoplazmy komórek nabłonkowych kanalików nerkowych badanych samców (Fot. 10B). Otrzymane wyniki mogą sugerować, że w nerkach tych zwierząt białko CTR1 pod wpływem wysokiego stężenia miedzi w moczu pierwotnym, wywołanego długotrwałą suplementacją chlorkiem miedzi (II), ulega internalizacji do cytoplazmy. Internalizacji białka CTR1 prowadzi do ograniczenia jego ekspresji w błonie apikalnej komórek kanalików, co skutkuje ograniczeniem transportu jonów miedzi do wnętrza komórek nabłonkowych kanalików. Wyniki te potwierdzają dotychczasowe, liczne doniesienia dotyczące internalizacji białka CTR1 do cytoplazmy pod wpływem wysokiego stężenia jonów miedzi (Clifford i wsp. 2016, Guo i wsp. 2004, Liang i wsp. 2012, Molloy i Kaplan 2009, Ooi i wsp. 1996, Petris i wsp. 2003). Cytoplazmatyczną ekspresję białka CTR1 obserwowano w komórkach pętli Henlego w części rdzennej nerki (Fot. 11B). W komórkach pętli Henlego obserwowano również silną ekspresję białka CTR1 w błonie bazalnej (Fot. 11B). Taka lokalizacja może wskazywać, że w tej części nefronu komórki pobierają jony miedzi z naczyń krwionośnych, a następnie jony tego pierwiastka wykorzystywane są na potrzeby metaboliczne komórek.

Otrzymane wyniki w obecnej pracy mogą sugerować, że proces internalizacji białka CTR1 do cytoplazmy jaki obserwowany jest w nerkach osobników 46-dniowych o genotypie

dzikim poddanych długotrwałej suplementacji chlorkiem miedzi (II) jest związany z ochroną tych komórek przed negatywnym działaniem wysokiego stężenia miedzi.

Prawdopodobnie u tych zwierząt w moczu pierwotnym występuję wysokie stężenie miedzi. Brak lokalizacji apikalnej białka CTR1 w komórkach nabłonkowych w kanalikach nerkowych może wskazywać, że reabsorpcja tego pierwiastka z moczu pierwotnego nie zachodzi w takim stopniu, jak u myszy kontrolnych, a w moczu suplementowanych samców pozostaje znacznie więcej niezreabsorbowanej miedzi. Intensywna suplementacja miedzią może bowiem prowadzić do podniesienia zawartości tego pierwiastka w moczu, co potwierdziły badania wykonane na szczurach (Haywood i wsp. 1985). Ponadto wzrost zawartości miedzi w moczu stwierdzono u myszy z knockoutem genu *Atp7b*, u których brak aktywności białka ATP7B prowadzi do podwyższenia zawartości tego pierwiastka w wątrobie (Gray i wsp. 2012).

Przeprowadzone w obecnej pracy ilościowe analizy poziomu ekspresji białka CTR1 w nerkach myszy 46-dniowych o genotypie dzikim, które poddane były suplementacji CuCl_2 wykonano za pomocą metody Western blot. Analizie densytometrycznej poddany był jedynie prążek odpowiadający aktywnej formie homotrimeru CTR1. Wyniki analizy wykazały spadek poziomu ekspresji badanego białka u zwierząt o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) w porównaniu do osobników kontrolnych (Ryc. 6). Obniżenie poziomu ekspresji formy homotrimeru białka CTR1 świadczy o nasileniu procesów internalizacji badanego białka z błony komórkowej do cytoplazmy w obrębie komórek nefronów, co związane jest z długotrwałym podawaniem suplementacji CuCl_2 u tych zwierząt.

Wyniki analizy ekspresji genu *Ctr1* w nerkach pochodzących od 46-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) wykazały spadek poziomu transkryptu badanego genu w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 12). Obniżenie ekspresji genu *Ctr1* może być spowodowane jego regulacją przez czynnik transkrypcyjny SP1, który łączy się z promotorem genu *Ctr1* i reguluje poziom jego ekspresji (Liang i wsp. 2012). Jak wykazały wyniki wcześniejszych badań nad regulacją ekspresji genu *Ctr1* przez SP1, jest ona zależna od wewnątrzkomórkowego stężenia jonów miedzi (Liang i wsp. 2012, Song i wsp. 2008). W warunkach wysokiego stężenia miedzi nie dochodzi do łączenia się czynnika transkrypcyjnego z promotorem genu *Ctr1* i tym samym poziom ekspresji genu *Ctr1* ekspresji ulega obniżeniu (Liang i wsp. 2012). Otrzymane wyniki mogą sugerować, że podobny proces może zachodzić w komórkach nefronów w nerkach myszy o genotypie dzikim poddanych długotrwałej suplementacji CuCl_2 . W procesie regulacji ekspresji genu *Ctr1* poprzez wysokie stężenie miedzi czynnik czasowy odgrywa bardzo

istotną rolę. Dlatego też prawdopodobnie w nerkach 14-dniowych samców mutantów *mosaic* pomimo wysokiej zawartości miedzi nie stwierdzono spadku ekspresji genu *Ctrl* w porównaniu z grupą kontrolną. Rolę czynnika czasowego potwierdziły również badania prowadzone na komórkach wątroby pochodzących od myszy z knockoutem genu *Atp7b*, które uznawane są za jeden ze zwierzęcych modeli choroby Wilsona (Ralle i wsp. 2010). U zwierząt tych miedź gromadzona jest w komórkach hepatocytów począwszy od 3 tygodnia życia osiągając bardzo wysoki poziom około 14 tygodnia życia. Spadek zawartości miedzi w wątrobie myszy *Atp7b*^{-/-} zaobserwowano w 20 tygodniu życia zwierząt. Jak wykazały wyniki przeprowadzonych badań spadek zawartości miedzi spowodowany był obniżeniem ekspresji mRNA dla genu *Ctrl*, a co za tym idzie również ekspresji białka CTR1. Zjawisko to związane było z uruchomieniem mechanizmu ochrony komórek hepatocytów przy zbyt długotrwałym działaniu wysokiego stężenia miedzi na te komórki (Ralle i wsp. 2010).

8. 5. 2. 3. Analiza ekspresji genu *Ctrl* oraz komórkowej lokalizacji białka CTR1 w nerkach mutantów *mosaic* (*Atp7a*^{mo-ms}) poddanych terapii CuCl₂ – osobniki 46-dniowe

Wyniki reakcji immunofluorescencyjnej wykazały, że w korze nerek 46-dniowych samców mutantów białko CTR1 wykazywało ekspresję głównie w błonie apikalnej komórek nabłonkowych kanalików nerkowych, jednak ekspresję badanego białka stwierdzono również w cytoplazmie tych komórek (Fot. 10C). Lokalizacja badanego białka w obrębie błony apikalnej komórek nabłonkowych kanalików jest związana z procesem reabsorpcji jonów miedzi z moczu pierwotnego przy udziale białka CTR1. Jednak u mutantów *mosaic* brak aktywności białka ATP7A uniemożliwia dalszy transport jonów miedzi z komórek nabłonkowych do naczyń krwionośnych oplatających kanaliki nerkowe (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz 2011, Lenartowicz i wsp. 2011, Lenartowicz i wsp. 2012a). W wyniku zaburzeń transportu, jony miedzi były akumulowane wewnątrz komórek kanalików nerkowych, co wpływało na wzrost zawartości miedzi w nerkach samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ (Wyk. 9). Wysoka zawartość miedzi w nerkach mutantów mogła przyczyniać się do obserwowanej internalizacji białka CTR1 do cytoplazmy komórek nabłonkowych kanalików, a nawet prowadzić do jego degradacji. Można przypuszczać, że obserwowana w komórkach części korowej internalizacja białka CTR1 z błony komórkowej do wnętrza cytoplazmy jest mechanizmem ochronnym, który chroni komórki przed negatywnym działaniem wysokiego stężenia jonów miedzi blokując jego transport do wnętrza komórek.

W badaniach prowadzonych na myszach *Atp7b*^{-/-} wykazano, że w komórkach wątroby pod wpływem bardzo wysokiego stężenia jonów miedzi dochodzi do internalizacji, a następnie degradacji białka CTR1 (Ralle i wsp. 2010). Internalizację i degradację białka CTR1 pod wpływem bardzo wysokiego stężenia jonów miedzi wykazano również w doświadczeniach przeprowadzonych *in vitro* (Clifford i wsp. 2016, Guo i wsp. 2004, Liang i wsp. 2012, Molloy i Kaplan 2009, Ooi i wsp. 1996, Petris i wsp. 2003).

W rdzeniu nerek 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ stwierdzono bardzo silną ekspresję białka CTR1 w błonie bazalnej komórek pętli Henlego (Fot. 11 C). Taka lokalizacja może sugerować, że dochodzi tam do procesów pobierania jonów miedzi z krwioobiegu do komórek nefronu, a wysoka ekspresja białka CTR1 może wskazywać na silny niedobór miedzi w komórkach rdzenia. Bardzo prawdopodobnym jest, że u 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ mocz, który dociera do pętli Henlego w obrębie rdzenia jest ubogi w miedź, gdyż pierwiastek ten został zabsorbowany w dużej mierze z moczu pierwotnego w początkowych odcinkach kanalików nerkowych. Jak już wcześniej wspomniano, mutanty *mosaic* cierpią na ogólnoustrojowy niedobór miedzi. Stosowanie u 46-dniowych mutantów *mosaic* terapii CuCl₂ pozwala na dostarczenie do organizmu dodatkowej ilości jonów miedzi, które mogą zostać zabsorbowane z moczu pierwotnego oraz z naczyń krwionośnych otaczających kanaliki nerkowe. Zarówno silna ekspresja białka CTR1 w błonie apikalnej komórek kanalików nerkowych, jak również wysoka ekspresja badanego białka w błonie bazalnej komórek pętli Henlego świadczyć mogą o nasilonych procesach transportu jonów miedzi zarówno z moczu pierwotnego, jak i z naczyń krwionośnych, co ma na celu pozyskanie jak największej ilości tego cennego dla organizmu mutantów pierwiastka. Jak już wcześniej wspomniano, prawdopodobnym jest, że nadmiar jonów miedzi w komórkach nerek zwierząt poddanych suplementacji związkami miedzi jest związany przez metalotioneinę, a także gromadzony w obrębie pęcherzyków cytoplazmatycznych, co również zapobiega toksycznemu działaniu tego pierwiastka na struktury komórkowe (Miyayama i wsp. 2009, Van den Berghe i wsp. 2007). Bardzo prawdopodobnym jest, że w ten właśnie sposób gromadzona jest miedź w komórkach kanalików nerkowych u 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂.

Metodą Western blot przeprowadzono analizę poziomu ekspresji białka CTR1 w nerkach 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) i pomimo obserwowanej u mutantów *mosaic* internalizacji do cytoplazmy białka CTR1 w komórkach kanalików nabłonkowych, nie odnotowano różnic statystycznie istotnych w porównaniu do wyników otrzymanych u osobników kontrolnych (Ryc. 6). Brak różnic można tłumaczyć tym,

że pomimo braku silnej apikalnej lokalizacji związanej z występowaniem trimery CTR1 w komórkach kanalików nerkowych u mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂, stwierdzono jednak bardzo silną ekspresję badanego białka w błonie bazalnej komórek pętli Henlego, gdzie również formą aktywną jest homotrimer CTR1.

Porównanie poziomu ekspresji białka CTR1 u obydwóch genotypów otrzymujących iniekcję chlorku miedzi (II), myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ oraz mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂, wykazało znaczne obniżenie ekspresji badanego białka u myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ (Ryc. 6). Różnice te wynikają z tego, że u tych zwierząt stwierdzono silną internalizację białka CTR1 występującą zarówno w obrębie komórek kanalików kory nerki, jak i komórek pętli Henlego. Wiadomo bowiem, że białko CTR1, które uległo internalizacji traci strukturę homotrimeru, a w cytoplazmie występuje w formie nieaktywnych dimerów oraz monomerów (Aller i Unger 2006, De Feo i wsp. 2009, Nose i wsp. 2006).

W nerkach pochodzących od 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii iniekcji CuCl₂ ekspresja genu *Ctr1* jest niższa w porównaniu do ekspresji tego genu u myszy kontrolnych (Wyk. 12.) Można przypuszczać, że podobnie jak w przypadku 46-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, również u 46-dniowych mutantów *mosaic* ekspresja genu *Ctr1* może być regulowana przy udziale czynnika transkrypcyjnego SP1. Wysoka zawartość miedzi w nerkach mutantów może być przyczyną obniżenia ekspresji genu *Ctr1*, gdyż w takich warunkach, w komórkach nie dochodzi do przyłączenia białka SP1 do promotora genu *Ctr1* (Liang i wsp. 2012, Song i wsp. 2008).

8. 5. 3. Analiza ekspresji genu *Ctr1* oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach 6 miesięcznych osobników

Przeprowadzone analizy z wykorzystaniem nerek pochodzących od myszy 6 miesięcznych o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic*, które w ciągu pierwszych 44 dni życia otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II), miało na celu sprawdzenie długotrwałego efektu suplementacji CuCl₂ na zmianę ekspresji genu oraz białka *Ctr1*/CTR1, a także komórkową lokalizację badanego białka w komórkach nefronu.

8. 5. 3. 1. Analiza ekspresji genu *Ctr1* oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach osobników o genotypie dzikim nieotrzymujących suplementacji CuCl₂ – osobniki 6 miesięczne

Wyniki analiz immunofluorescencyjnych wykonanych na skrawkach nerek pochodzących od 6 miesięcznych osobników o genotypie dzikim wykazały, że w

początkowym odcinku kanalików nerkowych białko CTR1 zlokalizowane jest zarówno w błonie apikalnej, jak i bazalnej komórek nabłonkowych kanalików (Fot. 13A). Analizy kolokalizacji białka CTR1 oraz białka akwaporyny 1 potwierdzają, że błonowy transporter zlokalizowany jest w komórkach kanalików proksymalnych (Fot. 16A). Wyniki przedstawione w obecnej pracy potwierdzają wcześniejsze doniesienia, że w procesie najintensywniejszej reabsorpcji miedzi z moczu biorą udział głównie proksymalne odcinki kanalików nerkowych (Kodama 1993, Moore i Cox 2002, Yoshimura 1994).

W części rdzennej kanalików nerki białko CTR1 zlokalizowane jest w błonie bazalnej komórek pętli Henlego (Fot. 14A). Lokalizacja taka pozwala na transport jonów miedzi z naczyń krwionośnych otaczających tę część nefronu do wnętrza komórek. Miedź ta zostaje następnie wykorzystana do podstawowych procesów metabolicznych komórek kanalików nefronu.

Ekspresję białka CTR1 w nerkach dorosłych samców o genotypie dzikim potwierdzono metodą Western blot (Ryc. 7). Obecność prążka odpowiadającego homotrimerowi wskazuje, że u myszy tych białko CTR1 występuje w komórkach nerek w aktywnej formie umożliwiającej transport jonów miedzi przez błonę komórkową do wnętrza tych komórek.

Za pomocą metody real time PCR potwierdzono ekspresję genu *Ctr1* w nerkach 6 miesięcznych osobników o genotypie dzikim (Wyk. 13).

8. 5. 3. 2. Analiza ekspresji genu *Ctr1* oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 6 miesięczne

W nerkach pochodzących od osobników 6 miesięcznych o genotypie dzikim, które przez okres pierwszych 44 dni życia były poddane suplementacji chlorkiem miedzi (II), białko CTR1 wykazuje, podobnie jak u samców kontrolnych, ekspresję w błonie apikalnej, jak i bazalnej komórek początkowych odcinków kanalików nerkowych (Fot. 13B). Kolokalizacja białka CTR1 oraz akwaporyny 1 wskazuje, że u myszy tych ekspresja białka CTR1 zachodzi w kanalikach proksymalnych (Fot. 16B). U obydwóch analizowanych grup myszy o genotypie dzikim, +/- (6) oraz +/-Cu(6), występuje bardzo podobna zawartość miedzi w nerkach (Wyk. 10). Ponadto zawartość miedzi w osoczu krwi 6 miesięcznych samców poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) była podobna, jak u grupy kontrolnej (Lenartowicz i wsp. 2017). Przedstawione w obecnej pracy wyniki wskazują, że w nerkach 6 miesięcznych samców poddanych suplementacji CuCl_2 , przy udziale białka CTR1, zachodzi procesach reabsorpcji jonów miedzi z moczu pierwotnego przez błonę apikalną komórek

kanalików nerkowych. U myszy tych również stwierdzono lokalizację białka CTR1 w błonie bazalnej kanalików nerkowych, co może sugerować, że przez błonę bazalną komórek kanalików nerkowych zachodzi również transport jonów miedzi z naczyń krwionośnych do komórek kanalików.

Przeprowadzone analizy lokalizacji białka CTR1 w części rdzennej nerek 6 miesięcznych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 wykazały ekspresję badanego białka w błonie bazalnej komórek pętli Henlego (Fot. 14B). Wyniki te świadczą o tym, że w obrębie komórek pętli Henlego, u zwierząt tej grupy badanej, jony miedzi zostają pobrane z krwioobiegu przy udziale białka CTR1, a następnie wykorzystane do podstawowych procesów metabolicznych komórek kanalików nefronu.

Analiza ilościowa homotrimeru białka CTR1 nie wykazała również różnic statystycznie istotnych pomiędzy 6 miesięcznymi samcami grupy kontrolnej, a samcami o genotypie dzikim suplementowanymi chlorkiem miedzi (II) (Ryc. 7). Brak również różnic statystycznie istotnych w poziomie ekspresji genu *Ctr1* pomiędzy grupami samców o genotypie dzikim +/- (6) oraz +/-Cu (6) (Wyk. 13).

Przedstawione w obecnej pracy wyniki świadczą o tym, że u zwierząt, u których około 4,5 miesiąca wcześniej zaprzestano suplementacji chlorkiem miedzi (II), procesy transportu miedzi w obrębie nerek przebiegają w sposób fizjologiczny. Otrzymane wyniki potwierdzają, że występowanie aktywnego białka ATP7A jest niezbędne dla prawidłowego procesu transportu i reabsorpcji jonów miedzi w kanalikach nerkowych.

8. 5. 3. 3. Analiza ekspresji genu *Ctr1* oraz lokalizacji białka CTR1 w nerkach mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 6 miesięczne

Wyniki analizy immunofluorescencyjnej, dotyczącej komórkowej lokalizacji białka CTR1 w nerkach pochodzących od 6 miesięcznych samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , wykazały, że białko to zlokalizowane jest głównie w błonie apikalnej komórek kanalików nerkowych (Fot. 13C). Jednak w przeciwieństwie do obydwóch grup osobników o genotypie dzikim, +/- (6) oraz +/-Cu (6), nie obserwowano ekspresji białka CTR1 w błonie bazalnej komórek kanalików nerkowych. Jednocześnie zaobserwowano, że część badanego białka ulega w tych komórkach internalizacji do cytoplazmy (Fot. 13C). Apikalna lokalizacja badanego białka może wskazywać na intensywny proces pobierania jonów miedzi z moczu pierwotnego w nerkach 6 miesięcznych mutantów *mosaic*. Jednocześnie słaby sygnał immunopozytywny w obrębie cytoplazmy komórek kanalików nerkowych wskazuje na internalizację, a następnie degradację białka CTR1 w tych komórkach. Procesy te związane są

z działaniem na białko CTR1 wysokiego stężenia miedzi zakumulowanej w wyniku braku aktywnego białka ATP7A w komórkach kanalików nerkowych u 6 miesięcznych mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II).

Analizy kolokalizacji białka CTR1 oraz białka akwaporyny 1 przeprowadzone na skrawkach nerek samców mutantów *mosaic* wykazały, że badane białko CTR1 zlokalizowane jest w komórkach proksymalnych odcinków kanalików nerkowych (Fot. 16C). Wyniki te potwierdzają wcześniejsze doniesienia, że w procesie najintensywniejszej reabsorpcji miedzi z moczu biorą udział głównie proksymalne odcinki kanalików nerkowych (Kodama 1993, Yoshimura 1994).

U mutantów *mosaic* w rdzennej części nerki białko CTR1 wykazuje silną ekspresję w błonie bazalnej komórek pętli Henlego, co wskazuje, że jony miedzi są pobierane przez te komórki z krwioobiegu (Fot. 14C). Otrzymane wyniki wskazują, że u 6 miesięcznych mutantów *mosaic* jony miedzi są bardzo intensywnie transportowane przy udziale białka CTR1 do komórek zarówno kanalików proksymalnych, jak komórek pętli Henlego. Tak intensywne pobieranie jonów miedzi przez komórki może wiązać się z tym, że dorosłe, 6 miesięczne mutanty *mosaic*, u których terapia stosowania chlorku miedzi (II) trwała przez pierwsze 44 dni życia, cierpią na ogólnoustrojowy niedobór miedzi. Potwierdzają to wyniki analizy wykonane metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej, które wykazały, że u samców mutantów *mosaic* poziom zawartości miedzi zarówno w wątrobie, jak i w osoczu jest obniżony (Lenartowicz i wsp. 2017). Jednocześnie u myszy mutantów *mosaic* na skutek braku aktywności białka ATP7A jony miedzi akumulowane są w obrębie kanalików nerkowych (Wyk. 10).

Pomimo różnic w komórkowej lokalizacji białka CTR1 pomiędzy 6 miesięcznymi samcami grupy kontrolnej oraz mutantami *mosaic* poddanymi terapii CuCl_2 , wykonana za pomocą metody Western blot analiza poziomu ekspresji białka CTR1 pomiędzy tymi grupami nie wykazała różnic statystycznie istotnych (Ryc. 7). Może to być spowodowane tym, że u myszy kontrolnych białko CTR1 wykazuje ekspresję zarówno w błonie apikalnej, jak i bazalnej komórek kanalików proksymalnych, natomiast u mutantów *mosaic* pomimo, że nie obserwowano ekspresji tego białka w błonie bazalnej komórek kanalików proksymalnych, to jednak immunopozytywny sygnał pochodzący z apikalnej błony komórek kanalików proksymalnych świadczył o niezwykle silnej ekspresji badanego białka. Ponadto obserwowano również bardzo silną ekspresję białka CTR1 w błonie bazalnej komórek pętli Henlego w części rdzennej nerek. Tym samym, sumaryczny efekt analizy poziomu ekspresji

białka CTR1 w nerkach 6 miesięcznych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ nie wykazał różnic w stosunku do grupy osobników kontrolnych.

Nie stwierdzono również zmian w poziomie ekspresji genu *Ctr1* w nerkach samców mutantów *mosaic* w porównaniu do osobników kontrolnych, jak i do osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) (Wyk. 13).

8. 6. Analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na ekspresję genu *Ctr2* w nerkach

W obecnej pracy przeprowadzono analizy dotycząc głównie ekspresji genu i białka *Ctr1*/CTR1, gdyż w komórkach ssaków jest ono głównym transporterem jonów miedzi (Aller i wsp. 2004, Aller i Unger 2006, De Feo i wsp. 2007, De Feo i wsp. 2009, Larson i wsp. 2010). Jak wykazały wyniki badań, aż 80% miedzi pobieranej przez komórki transportowane jest przez błonę przy udziale białka CTR1 (Larson i wsp. 2010). Białko CTR2 w bardzo małym procencie bierze udział w transporcie miedzi przez błonę komórkową, stwierdzono bowiem, że tylko 5% białka CTR2 zlokalizowane jest w błonie plazmatycznej, a pozostałe 95% ma lokalizację wewnątrzkomórkową (Bertinato i wsp. 2008). Białko to w obrębie komórki zlokalizowane jest w błonach endosomów i lizosomów, gdzie odpowiada za eksport miedzi z tych organelli (Rees i wsp. 2004). Przy udziale białka CTR2 z lizosomów do cytoplazmy uwalniane są jony miedzi, które powstają po rozpadzie miedziozależnych białek. Jony te w ten sposób mogą być ponownie wykorzystane w procesach metabolicznych (Gupta i Lutsenko 2009). Wyniki najnowszych badań wykazały również, że białko CTR2 reguluje aktywność białka CTR1, gdyż przy udziale białka CTR2 tworzona jest skrócona, niezawierająca domeny zewnątrzkomórkowej, forma białka CTR1 (Ohrvik i wsp. 2013).

Ponieważ głównym transporterem miedzi do komórek nabłonkowych kanalików nerkowych jest białko CTR1, dlatego też w obecnej pracy ograniczono się tylko do przeprowadzenia analiz poziomu ekspresji genu *Ctr2*. Wyniki te mogą być o tyle interesujące, że dotychczas bardzo niewiele wiadomo jest o sposobie regulacji ekspresji tego genu. W obecnej pracy po raz pierwszy pokazano ekspresję genu *Ctr2* w nerkach różnych grup wiekowych myszy, zarówno w stanie fizjologicznym, jak i patologicznym.

Przeprowadzone analizy wskazują, że u wszystkich badanych grup zwierząt występuje ekspresja genu *Ctr2* w badanym organie (Fot. 17, Wyk.14-16). Jednocześnie wyniki przeprowadzonych analiz w nerkach pochodzących od osobników o genotypie dzikim oraz od mutantów *mosaic* poddanych oraz niepoddanych iniekcji CuCl₂ wskazują, że ekspresja

badanego genu zależna jest od poziomu miedzi w badanym organie.

8. 6. 1. Analiza ekspresji genu *Ctr2* w nerkach osobników 14-dniowych

Analizy ekspresji genu *Ctr2* przeprowadzone w nerkach myszy 14-dniowych miały na celu sprawdzenie czy poziom ekspresji badanego genu zmienia się pod wpływem podawania chlorku miedzi (II) w początkowym okresie życia.

8. 6. 1. 1. Analiza ekspresji genu *Ctr2* w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Przeprowadzone analizy ekspresji genu *Ctr2* w nerkach pochodzących od młodych 14-dniowych osobników o genotypie dzikim, które poddane były suplementacji chlorkiem miedzi (II) wykazały spadek ekspresji badanego genu w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 14). W nerkach tych zwierząt procesy absorpcji miedzi z moczu pierwotnego przez komórki kanalików nerkowych są nasilone, o czym świadczą przedstawione w obecnej pracy wyniki ekspresji genu oraz białka *Ctr1*/CTR1 (Fot. 6B, Wyk. 11.). W nerkach młodych samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 nie dochodzi jednak do akumulacji miedzi, co z kolei wskazuje na sprawny mechanizm reabsorpcji tego pierwiastka do krwioobiegu, który zachodzi przy udziale białka ATP7A (Lenartowicz i wsp. 2017). W komórkach kanalików nerkowych myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 dochodzi do spadku ekspresji genu *Ctr2*. Można przypuszczać, że obniżony poziom ekspresji badanego genu u tych zwierząt może pośrednio wskazywać również na obniżony poziom ekspresji białka CTR2. Niska ekspresja białka CTR2 może wręcz zapobiegać akumulowaniu jonów miedzi w obrębie pęcherzyków cytoplazmatycznych zlokalizowanych w cytoplazmie komórek kanalików nerkowych (Rees i wsp. 2004).

8. 6. 1. 2. Analiza ekspresji genu *Ctr2* w nerkach mutantów *mosaic* ($\text{Atp7a}^{\text{mo-ms}}$) niepoddanych terapii CuCl_2 oraz mutantów *mosaic* ($\text{Atp7a}^{\text{mo-ms}}$) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Analizy przeprowadzone w nerkach pochodzących od samców mutantów *mosaic* wykazały, że poziom ekspresji genu *Ctr2* uległ znacznemu obniżeniu, a zmiany te są statystycznie istotne w porównaniu do grupy kontrolnej (Wyk. 14). W nerkach tych zwierząt w wyniku braku aktywności komórkowego transportera jonów miedzi, białka ATP7A, akumulowana jest miedź (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i

wsp. 2012a). Znaczne obniżenie ekspresji genu *Ctr2* w komórkach nerek mutantów *mosaic* może wskazywać, że ekspresja tego genu jest zależna od zawartości miedzi (Wyk. 8). Obniżenie ekspresji genu *Ctr2* stwierdzono w nerkach myszy mutantów *mosaic* niepoddanych oraz poddanych terapii CuCl_2 (Wyk. 14), co można tłumaczyć, jako regulację ekspresji genu *Ctr2* związaną z podwyższoną zawartością miedzi w nerkach tych zwierząt (Wyk. 8). Ponadto stwierdzono, że u obydwóch grup badanych mutantów poziom ekspresji genu *Ctr2* jest znacznie obniżony nie tylko w stosunku do grupy kontrolnej, ale również w stosunku do grupy myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II), u których nie zaobserwowano akumulacji miedzi w obrębie nerek (Wyk. 14). Otrzymane wyniki mogą wskazywać, że u 14-dniowych myszy ekspresja genu *Ctr2* jest regulowana poprzez zawartość miedzi w nerkach.

8. 6. 2. Analiza ekspresji genu *Ctr2* w nerkach osobników 46-dniowych

Przeprowadzone analizy poziomu ekspresji genu *Ctr2* w nerkach 46-dniowych zwierząt miały na celu sprawdzenie czy podawanie chlorku miedzi (II) przez okres 44 dni w regularnych, 2-dniowych odstępach, ma wpływ na zmianę poziomu ekspresji genu *Ctr2*.

8. 6. 2. 1. Analiza ekspresji genu *Ctr2* w nerkach osobników o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 46-dniowe

Podobnie, jak u myszy 14-dniowych, również u osobników 46-dniowych, podawanie chlorku miedzi (II) wpływa na obniżenie ekspresji genu *Ctr2* u obydwóch suplementowanych grup – samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 oraz samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 (Wyk. 15). Ekspresja genu *Ctr2* u osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 była niższa niż u samców kontrolnych, jednak w przeciwieństwie do myszy 14-dniowych, nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy ekspresją tego genu u samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 oraz mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 . Jakkolwiek, zawartość miedzi w nerkach 46-dniowych samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 jest znacznie wyższa niż u samców 46-dniowych samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) (Wyk. 9). Otrzymane wyniki wskazują, że obniżenie poziomu ekspresji genu *Ctr2* w nerkach u osobników 46-dniowych o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) jest związane z długotrwałym działaniem podwyższonego, ogólnoustrojowego stężenia jonów miedzi. Natomiast u 46-dniowych myszy mutantów *mosaic* poddanych terapii

CuCl₂ obniżony poziom ekspresji genu *Ctr2* najprawdopodobniej związany jest z bardzo wysoką zawartością miedzi w obrębie komórek nabłonkowych kanalików nerkowych. W przypadku 46-dniowych mutantów *mosaic* regulacja ekspresji genu *Ctr2* przypominać może tą, która występuje u młodych, 14-dniowych mutantów *mosaic*.

8. 6. 3. Analiza ekspresji genu *Ctr2* w nerkach osobników 6 miesięcznych

Przeprowadzone analizy z wykorzystaniem nerek pochodzących od 6 miesięcznych myszy o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic*, które w ciągu pierwszych 44 dni życia otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II), miało na celu sprawdzenie długotrwałego działania suplementacji CuCl₂ na zmianę poziomu ekspresji genu *Ctr2*.

8. 6. 3. 1. Analiza ekspresji genu *Ctr2* w nerkach osobników o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych suplementacji CuCl₂ – osobniki 6 miesięczne

Analizy przeprowadzone metodą real time PCR w nerkach pochodzących od 6 miesięcznych osobników o genotypie dzikim, u których suplementacja chlorkiem miedzi (II) została zakończona w 44 dniu życia, nie wykazały różnic w poziomie ekspresji genu *Ctr2* w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 16). W komórkach nerek tych zwierząt białko ATP7A jest w pełni funkcjonalne, dlatego też procesy reabsorpcji jonów miedzi z moczu, a następnie do naczyń krwionośnych otaczających kanaliki nerkowe, zachodzą w sposób prawidłowy. U samców tych zawartość miedzi w nerkach była podobna jak u osobników kontrolnych, dlatego też poziom ekspresji genu *Ctr2* w nerkach u tych zwierząt jest porównywalny, jak u myszy kontrolnych (Wyk. 16).

Natomiast u samców mutantów *mosaic* nieoczekiwanie stwierdzono podniesienie ekspresji genu *Ctr2* w stosunku do obydwu grup myszy o genotypie dzikim, pomimo, że zawartość miedzi w nerkach 6 miesięcznych samców mutantów *mosaic* jest znacznie wyższa niż u obydwu grup badanych myszy o genotypie dzikim (Wyk. 10). Otrzymane wyniki mogą wskazywać, że mechanizm regulacji genu *Ctr2* w nerkach dorosłych, 6 miesięcznych mutantów jest inny niż u myszy młodych, 14-dniowych, jak również inny w porównaniu do grupy 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych w trybie ciągłym suplementacji chlorkiem miedzi (II). U 6 miesięcznych mutantów *mosaic* jedynym źródłem miedzi jest pokarm, jednak obniżona zawartość tego pierwiastka w osoczu i wątrobie pozwala przypuszczać, że dochodzi u nich do akumulacji miedzi w ścianie jelita cienkiego, co stwierdzono wcześniej u dorosłych mutantów *mosaic* (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2017). W nerkach samców mutantów *mosaic* miedź akumulowana jest w obrębie komórek kanalików nerkowych, jednak

w pozostałej części nefronu może występować niedobór tego pierwiastka, o czym świadczyć może bardzo wysoka ekspresja białka CTR1 w błonie bazalnej komórek petli Henlego w rdzeniu nerek (Fot. 14C). Ograniczona ilość miedzi dostarczanej do komórek rdzenia nerki może wpływać na podniesienie ekspresji genu *Ctr2* (Bertinato i wsp. 2008). Prawdopodobnie w nerkach 6 miesięcznych samców mutantów *mosaic* wzrost ekspresji badanego genu prowadzi również do wzrostu ekspresji białka CTR2, co pozwala na uwalnianie jonów miedzi zmagazynowanych w obrębie lizosomów komórek wykazujących niedobór tego pierwiastka.

8. 7. Analiza wpływu zastosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na ekspresję genu *Atox1*, a także wewnątrzkomórkową lokalizację białka *ATOX1* w komórkach nerkach

Białko ATOX1 pełni w komórkach dwie główne funkcje, jest metalochaperonem, a równocześnie, jak wykazały ostatnie badania, jest również czynnikiem transkrypcyjnym regulującym ekspresję genów (Hung i wsp. 1998, Itoh i wsp. 2008, Itoh i wsp. 2009, Lin i wsp. 1997, Prohaska i Gybina 2004). Jako metalochaperon białko to wchodzi w interakcje z C-kończową domeną białka CTR1, przyłącza jony miedzi i transportuje je w obrębie cytoplazmy do zlokalizowanych w błonach aparatu Golgiego białek ATP7A i ATP7B (Hung i wsp. 1998, Lin i wsp. 1997, Prohaska i Gybina 2004). Dlatego też w większości komórek, w których zachodzi intensywny transport jonów miedzi, takich jak komórki enterocytów, czy komórki endotelialne śródbłónka naczyń krwionośnych, obserwowano cytoplazmatyczną ekspresję białka ATOX1 (Das i wsp. 2016, Hung i wsp. 1998, Lin i wsp. 1997, Prohaska i Gybina 2004). Jak wykazały wyniki przeprowadzonych badań, białko to może przyjmować również lokalizację jądrową, gdzie łącząc się do charakterystycznych sekwencji promotorów genów *Ccnd1* kodującego cyklinę D1 oraz genu kodującego dysmutazę nadadtlenkową SOD3, reguluje ich ekspresję (Itoh i wsp. 2008, Itoh i wsp. 2009, Jeney i wsp. 2005, Qin i wsp. 2006). Białko ATOX1 wchodzi również w interakcję z białkami kompleksu APC (ang. *anaphase-promoting complex*), który ułatwia zajście procesów anafazy poprzez degradację białek kinetochoru (Dzebo i wsp. 2018). Tym samym wykazano, że białko ATOX1 pełni ważną rolę w regulacji cyklu komórkowego. Wiele dotychczasowych badań wskazuje na to, że białko ATOX1 może odgrywać kluczową rolę w procesach nowotworzenia. Wiele typów komórek nowotworowych, do których zaliczane są między innymi linie niedrobnokomórkowego raka płuc (A549, H460, H1299, H1355), komórki raka jelita grubego (HCT-116), czy komórek czerniaka (M3), wykazuje nadekspresję białka ATOX1 (Beaino i wsp. 2014, Cai i Peng 2013). W przypadku komórek nowotworowych obserwuje się również

podwyższony poziom wewnątrzkomórkowego stężenia miedzi (Arnold i Sasse 1961, Daniel i wsp. 2004, Fuchs i Lustig 1989, Itoh i wsp. 2008).

Wyniki analizy histologicznej nerek pochodzących od dorosłych myszy poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II), zarówno tych o genotypie dzikim, jak i samców mutantów *mosaic*, wykazały, że w obrębie nerek tych zwierząt występuje zjawisko nieprawidłowej proliferacji komórek kanalików nerkowych. Komórki takie tworzyły kilka warstw oraz miały zmienioną morfologię. Stwierdzono również, że w wypełnionych płynem cystach zlokalizowanych w obrębie kory nerki dochodzi do proliferacji atypowych komórek, które tworzą tam skupiska, co może być początkiem procesów nowotworowych (Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz 2011).

W obecnej pracy analizowano zmiany poziomu ekspresji genu *Atox1*, jak również, przy użyciu metody immunofluorescencyjnej, badano wewnątrzkomórkową lokalizację białka ATOX1 w komórkach nerek. W obecnej pracy postanowiono sprawdzić, czy u samców mutantów *mosaic*, pod wpływem nadmiaru miedzi w komórkach nerek, dochodzi do transportu białka ATOX1 do jądra komórkowego, gdzie białko to łącząc się z DNA może stymulować ekspresję genu *Ccnd1*, a tym samym wpływać na przyspieszenie podziałów komórek kanalików nerkowych. Zawartość miedzi w komórkach może mieć wpływ na lokalizację badanego białka, gdyż do jądra komórkowego transportowane jest białko ATOX1 w postaci związanej z jonami miedzi (Itoh i wsp. 2008, Itoh i wsp. 2009). Przeprowadzone w obecnej pracy analizy wskazują, że w nerkach u wszystkich badanych grup zwierząt występuje zarówno ekspresja genu *Atox1* (Fot. 18, Wyk. 17-19), jak i białka ATOX1 (Fot. 19, 21, 23).

8. 7. 1. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach 14-dniowych osobników

Przeprowadzone analizy z wykorzystaniem nerek pochodzących od myszy 14-dniowych miały na celu sprawdzenie czy podawanie chlorku miedzi (II) w początkowym okresie życia ma wpływ na zmianę poziomu ekspresji genu *Atox1*, a także na wewnątrzkomórkową lokalizację badanego białka ATOX1.

8. 7. 1. 1. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników o genotypie dzikim niepoddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Przedstawione w obecnej pracy wyniki dotyczące lokalizacji białka ATOX1 w komórkach nerek pochodzących od 14-dniowych zwierząt o genotypie dzikim wykazały, że

białko to zlokalizowane jest w cytoplazmie komórek kanalików nerkowych. Cytoplazmatyczna lokalizacja badanego białka jest związana z transportem jonów miedzi przez białko ATOX1 do białka ATP7A oraz ATP7B zlokalizowanych w błonach aparatu Golgiego (Hamza i wsp. 2003, Hung i wsp. 1998, Lin i wsp. 1997, Lutsenko i wsp. 2003, Prohaska i Gybina 2004, Wernimont i wsp. 200). Jednocześnie przeprowadzone analizy wykazały, że białko to nie przyjmuje lokalizacji w jądrze komórkowym, co równocześnie wskazuje, że w nerkach badanych osobników białko to pełni głównie rolę metalochaperonu (Fot. 19A).

8. 7. 1. 2. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Przedstawione w obecnej pracy wyniki ekspresji genu *Atox1* u 14-dniowych myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) nie wykazały różnic statystycznie istotnych w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 17). U tych zwierząt również zawartość miedzi w nerkach jest porównywalna do tej obserwowanej u zwierząt o genotypie dzikim (Wyk. 8). Jakkolwiek możemy obserwować pewną tendencję wzrostu poziomu mRNA dla genu *Atox1* ($p=0,08$), co równocześnie ma swoje odzwierciedlenie w wysokiej intensywności sygnału immunopozytywnego obserwowanego na preparatach skrawków mrozeniowych nerek pochodzących od 14-dniowych samców tej grupy badanej (Fot. 19B). Analiza preparatów mikroskopowych wykazała, że białko ATOX1 w komórkach nerek pochodzących od zwierząt tej grupy zlokalizowane jest w cytoplazmie komórkowej, gdzie wykazuje silną ekspresję, natomiast nie wykazuje ono lokalizacji w jądrze komórkowym. Otrzymane wyniki wskazują, że u samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 białko to pełni głównie rolę metalochaperonu. Białko ATOX1 nie tylko dostarcza miedź do N-końcowej domeny białek ATP7A i ATP7B, ale również reguluje ich aktywność (Hatori i Lutsenko 2013). Prawdopodobnie w ten sposób u 14-dniowych myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 wzrost ekspresji białka ATOX1 obserwowany na preparatach immunofluorescencyjnych może być związany z nasilonym procesem transportu jonów miedzi przez białka ATP7A, co służy utrzymaniu prawidłowego poziomu miedzi w nerkach samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 . Porównywalne wyniki zawartości miedzi w nerkach 14-dniowych zwierząt o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 do wyników zwierząt pochodzących z grupy kontrolnej świadczą o tym, że u tych zwierząt pomimo dodatkowej ilości miedzi pochodzącej z podskórnych iniekcji chlorkiem miedzi (II) procesy reabsorpcji tego pierwiastka z moczu

pierwotnego do komórek kanalików nerkowych, a następnie do naczyń krwionośnych zachodzą w sposób prawidłowy. Utrzymanie prawidłowej, komórkowej homeostazy jonów miedzi w nerkach tych zwierząt związane jest z prawidłową aktywnością białka ATOX1, a także białka ATP7A.

8. 7. 1. 3. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) niepoddanych terapii CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Przeprowadzone analizy wyników poziomu ekspresji genu *Atox1* u 14-dniowych mutantów *mosaic* nie wykazały różnic statystycznie istotnych w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 17). Ponadto wykonane analizy lokalizacji białka ATOX1 w obrębie komórek kanalików nerkowych u tych zwierząt wykazały, że białko to zlokalizowane jest głównie w cytoplazmie i nie wykazuje ono lokalizacji w jądrze komórkowym (Fot. 19C).

Przedstawione w obecnej pracy wyniki świadczą o tym, że wzrost zawartości miedzi w nerkach mutantów *mosaic*, który jest skutkiem braku aktywności transportera ATP7A, nie wpływa na zmiany ekspresji genu *Atox1*, jak również na relokalizację białka ATOX1 z cytoplazmy do jądra komórkowego. Badania przeprowadzone na komórkach fibroblastów pochodzących od myszy knockoutów *Atox1^{-/-}* wykazały, że w komórkach inkubowanych w medium zawierającym miedź, poziom zawartości tego pierwiastka w obrębie komórek wzrasta, co potwierdza, że białko to jest bardzo istotne dla utrzymania stałego poziomu miedzi w komórkach (Hamza i wsp. 2001).

W obrębie komórek kanalików nerkowych u 14-dniowych mutantów *mosaic* białko ATP7A, które jest jednym z głównych odbiorców jonów miedzi od białka ATOX1, jest нефunkcjonalne. Bardzo prawdopodobnym jest, że białko ATOX1, pomimo niskiej ekspresji białka ATP7B w nerkach, przekazuje jony miedzi do tego transportera (Barnes i wsp. 2009, Linz i wsp. 2008, Wiggins i wsp. 2006).

Przedstawione w obecnej pracy wyniki świadczą o tym, że wysokie stężenie miedzi w nerkach 14-dniowych samców mutantów *mosaic* nie wpływa na zmianę ekspresji genu *Atox1*. Jednocześnie cytoplazmatyczna lokalizacja białka ATOX1 w obrębie komórek kanalików nerkowych u tych zwierząt świadczy o tym, że białko to pełni głównie rolę metalochaperonu dla jonów miedzi.

8. 7. 1. 4. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka *ATOX1* w nerkach mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Poziom ekspresji genu *Atox1* w nerkach pochodzących od 14-dniowych myszy mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) jest porównywalny do obserwowanego u osobników kontrolnych, jednak jest on statystycznie istotnie niższy w porównaniu do poziomu obserwowanego w przypadku zwierząt o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (Wyk. 17). W przypadku mutantów *mosaic* poddanych terapii zawartość miedzi w nerkach jest znacznie wyższa w porównaniu do osobników kontrolnych oraz osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 . Stężenie miedzi w komórkach kanalików nerkowych u tych zwierząt jest niezwykle wysokie i osiąga ono poziom wręcz toksyczny, o czym świadczyć mogą silne zmiany w strukturze oraz funkcji nerek tych zwierząt (Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz 2011). Otrzymane wyniki mogą sugerować, że na obniżenie ekspresji genu *Atox1* u myszy mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 może wpływać wysoki poziom miedzi w nerkach tych zwierząt. Obniżenie ekspresji genu *Atox1* pod wpływem wysokiego stężenia jonów miedzi obserwowano również u psów, które nie posiadały aktywnego białka COMMD1 odpowiedzialnego w hepatocytach za transport jonów miedzi do żółci (Favier i wsp. 2015, Materia i wsp. 2012, Vonk i wsp. 2012). U zwierząt tych obserwuje się akumulację miedzi w wątrobie do poziomu toksycznego, co prowadzi do zaburzeń funkcji tego organu wynikających z negatywnego działania stresu oksydacyjnego. U tych zwierząt zjawisko to wywołuje powstanie stanu zapalnego wątroby, co z kolei skutkuje silnymi zmianami w obrębie wewnątrzkomórkowych struktur hepatocytów, a w szczególności mitochondriów, które są głównym źródłem produkcji wolnych rodników (Koopman i wsp. 2010, Sokol i wsp. 1994, Zischka i wsp. 2011). Równocześnie badania ekspresji genu *Atox1*, kodującego białko ATOX1 będącego jednym z komórkowych czynników przeciwdziałających negatywnemu działaniu stresu oksydacyjnego, wykazały spadek ekspresji badanego genu w hepatocytach badanych zwierząt (Favier i wsp. 2015). Przeprowadzone badania na młodych, 21-dniowych świnich, które poddane były suplementacji związkami miedzi przez okres około 12 dni, wykazały, że w dwunastnicy tych zwierząt poziom zawartości miedzi był 5-krotnie wyższy w porównaniu do osobników kontrolnych. Równocześnie u zwierząt tych zaobserwowano spadek poziomu mRNA dla genu *Atox1* w dwunastnicy (Huang i wsp. 2015).

Przytoczone dane mogą wskazywać, że wzrost miedzi w komórkach aż do poziomu silnie toksycznego powoduje obniżenie ekspresji genu *Atox1*. U 14-dniowych samców mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) na skutek nadmiaru gromadzonej

miedzi w obrębie komórek kanalików nerkowych poziom ekspresji genu *Atox1* ulega obniżeniu. Wpływ na zmianę ekspresji badanego genu ma znacznie wyższy poziom miedzi w nerkach tych zwierząt w porównaniu do mutantów *mosaic* niepoddanych terapii. Przeprowadzone analizy lokalizacji białka ATOX1 w komórkach kanalików nerkowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 wykazały, że białko to zlokalizowane jest w cytoplazmie tych komórek, jednak nie ulega ono relokalizacji do jądra komórkowego (Fot. 19D). Zmian takich nie obserwowano zarówno w komórkach, w których jądra komórkowe miały prawidłową wielkość, jak i w komórkach w których występowała kariomegalia. Otrzymane wyniki mogą wskazywać, że zlokalizowane w cytoplazmie komórek kanalików nerkowych białko ATOX1 pełni rolę metalochaperonu, jednak ze względu na brak aktywnego białka ATP7A transport jonów miedzi w obrębie tych komórek jest ograniczony.

8. 7. 2. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników 46-dniowych

Przeprowadzone analizy miały na celu sprawdzenie czy podawanie chlorku miedzi (II) przez okres 44 dni w regularnych, 2-dniowych odstępach, ma wpływ na zmianę poziomu ekspresji genu *Atox1*, a także komórkową lokalizację badanego białka ATOX1 w nerkach u myszy 46-dniowych.

8. 7. 2. 1. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników o genotypie dzikim niepoddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 46-dniowe

Przeprowadzone w obecnej pracy analizy lokalizacji białka ATOX1 w nerkach myszy 46-dniowych o genotypie dzikim wykazały, że białko to w komórkach kanalików nerkowych zlokalizowane jest w cytoplazmie i nie wykazano jego lokalizacji w jądrze komórkowym (Fot. 21A). Wyniki te świadczą o tym, że białko ATOX1 w komórkach kanalików nerkowych pełni głównie rolę transportera zabsorbowanych jonów miedzi, do białka ATP7A i ATP7B zlokalizowanych w błonach aparatu Golgiego (Hamza i wsp. 2003, Hung i wsp. 1998, Lin i wsp. 1997, Lutsenko i wsp. 2003, Prohaska i Gybina 2004, Wernimont i wsp. 200).

8. 7. 2. 2. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 46-dniowe

Analiza ekspresji genu *Atox1* w nerkach pochodzących od osobników 46-dniowych o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) wykazała, że poziom

ekspresji badanego genu nie różni się od tego, jaki występuje u osobników kontrolnych (Wyk. 18). Równocześnie badanie zawartości miedzi w nerkach tych myszy wykazało, że pomimo podawania dodatkowej ilości tego pierwiastka w postaci iniekcji CuCl_2 poziom badanego pierwiastka był zbliżony do tego, jaki występował u samców kontrolnych (Wyk. 9). Podobne wyniki badań otrzymano analizując poziom ekspresji genu *Atox1* w nerkach słodkowodnych ryb *Pelteobagrus fulvidraco*. Zwierzęta te przez okres 8 tygodni otrzymywały dietę bogatą w miedź, a przeprowadzone analizy nie wykazały zmian w poziomie badanego genu w porównaniu do osobników kontrolnych otrzymujących standardową dietę (Cheng i wsp. 2017).

Wyniki analizy immunofluorescencyjnej wskazują, że w komórkach nerek 46-dniowych myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 białko ATOX1 zlokalizowane jest w cytoplazmie, jednak nie zaobserwowano lokalizacji tego białka w obrębie jądra komórkowego (Fot. 21B). Wyniki te świadczą o tym, że białko ATOX1 w tych komórkach pełni głównie rolę metalochaperonu. Utrzymanie stałego poziomu jonów miedzi w nerkach myszy suplementowanych CuCl_2 może być związane ze sprawnym transportem tego pierwiastka w obrębie komórki przez białko ATOX1, a następnie jego przekazaniu do krwioobiegu przez białko ATP7A.

8. 7. 2. 3. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 46-dniowe

Analizy ekspresji genu *Atox1* przeprowadzone w nerkach 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) wykazały spadek poziomu ekspresji badanego genu w porównaniu do grupy kontrolnej oraz w porównaniu do osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 (Wyk. 18). Obserwowany spadek ekspresji badanego genu w nerkach 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) wywołany jest prawdopodobnie działaniem długotrwałego, wysokiego stężenia miedzi w komórkach nerek. Podobny spadek ekspresji genu *Atox1* obserwowany był w wątrobie psów, które nie posiadały aktywnego białka COMMD1 odpowiedzialnego w hepatocytach za transport jonów miedzi do żółci (Favier i wsp. 2015).

Analizy lokalizacji białka ATOX1 w komórkach kanalików nerkowych u tych zwierząt nie wykazały różnic w porównaniu do osobników o genotypie dzikim, gdyż w komórkach kanalików nerkowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 białko to zlokalizowane jest w cytoplazmie i nie ulega ono relokalizacji do jądra komórkowego (Fot. 21C). Wynik ten świadczy o tym, że w komórkach kanalików nerkowych białko ATOX1

pełni głównie funkcję cytoplazmatycznego transportera jonów miedzi. Jak wykazały wyniki wcześniejszych badań, nadmiar jonów miedzi w obrębie komórek może być wiązany przez cytoplazmatyczne białko metalotioneinę, a także w obrębie pęcherzyków cytoplazmatycznych (Miyayama i wsp. 2009). Być może że w takiej formie również akumulowana jest miedź w obrębie komórek kanalików nerkowych w nerkach 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , u których poziom zawartości miedzi jest 12-krotnie wyższy w porównaniu do tego obserwowanego u osobników kontrolnych. Jednak część jonów miedzi dostarczanych z moczu pierwotnego do wnętrza komórek kanalików nerkowych może zostać związana również do białka ATOX1, który transportowany jest w obrębie cytoplazmy do swoich białek akceptorowych, ATP7A i ATP7B, na co mogą wskazywać przedstawione w obecnej pracy wyniki cytoplazmatycznej lokalizacji badanego białka ATOX1 (Fot. 21C). U osobników mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 białko ATP7A jest produkowane, jednak nie pełni ono swojej funkcji transportera jonów miedzi, dlatego dochodzi do akumulacji tego pierwiastka w nerkach samców mutantów *mosaic*.

8. 7. 3. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach 6 miesięcznych osobników

Przeprowadzone analizy z wykorzystaniem nerek pochodzących od 6 miesięcznych myszy o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic*, które w ciągu pierwszych 44 dni życia otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II), miało na celu sprawdzenie długotrwałego działania suplementacji CuCl_2 na zmianę poziomu ekspresji genu *Atox1*, a także komórkową lokalizację badanego białka ATOX1.

8. 7. 3. 1. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka ATOX1 w nerkach osobników o genotypie dzikim niepoddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 6 miesięczne

Przeprowadzone analizy lokalizacji białka ATOX1 w nerkach pochodzących od 6 miesięcznych osobników o genotypie dzikim wykazały, że badane białko zlokalizowane jest w obrębie cytoplazmy komórek kanalików nerkowych. Jednocześnie białko ATOX1 nie przyjmuje lokalizacji w jądrach komórkowych komórek kanalików (Fot. 23A). Przedstawione w obecnej pracy wyniki świadczą o tym, że białko ATOX1 w komórkach kanalików nerkowych pełni rolę głównie metalochaperonu transportującego jony miedzi do białek ATP7A oraz ATP7B (Hamza i wsp. 2003, Hung i wsp. 1998, Lin i wsp. 1997, Lutsenko i wsp. 2003, Prohaska i Gybina 2004, Wernimont i wsp. 200).

8. 7. 3. 2. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka *ATOX1* w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 – osobniki 6 miesięczne

Przeprowadzone analizy ekspresji genu *Atox1* w nerkach myszy 6 miesięcznych o genotypie dzikim, które były poddane suplementacji chlorkiem miedzi (II) nie wykazały różnic statystycznie istotnych w porównaniu do osobników grupy kontrolnej (Wyk. 19). Również analizy zawartości miedzi w nerkach samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 poddanych suplementacji CuCl_2 były zbliżone do tych jakie obserwowano u samców kontrolnych. Prawdopodobnie dlatego też stężenie jonów miedzi nie jest tutaj czynnikiem wpływającym na regulację ekspresji genu *Atox1* (Wyk. 10).

U myszy o genotypie dzikim otrzymujących suplementację CuCl_2 białko *ATOX1* było zlokalizowane w cytoplazmie komórek kanalików nerkowych, natomiast nie stwierdzono relokalizacji badanego białka do jądra komórkowego. Wyniki te mogą świadczyć o tym, że zmiany w proliferacji komórek, jakie są obserwowane w nerkach około 6 miesięcznych samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 powstają na innej drodze niż poprzez indukcję ekspresji cykliny D1 przez białko *ATOX1*. Wyniki te świadczą również o tym, że białko *ATOX1* w komórkach kanalików nerkowych u 6 miesięcznych myszy o genotypie dzikim, które poddane były suplementacji chlorkiem miedzi (II), pełni głównie rolę metalochaperonu. U zwierząt tej grupy suplementacja dodatkową ilością miedzi w postaci iniekcji CuCl_2 została zakończona 4,5 miesiąca wcześniej, co pozwoliło na całkowite unormowanie się procesów pobierania jonów miedzi z moczu pierwotnego przez białko *CTR1*, a także wyregulowanie stężenia miedzi w moczu pierwotnym (Fot. 23B). Białko *ATP7A* transportujące jony miedzi w obrębie komórek kanalików nerkowych jest w pełni funkcjonalne, dzięki czemu transport ten nie jest zaburzony. Tym samym procesy reabsorpcji miedzi z moczu pierwotnego do naczyń krwionośnych otaczających kanaliki nerkowe u tych zwierząt zachodzą w sposób prawidłowy, co potwierdzają przedstawione wyniki poziomu ekspresji genu *Atox1*, jak i cytoplazmatycznej lokalizacji białka *ATOX1* w obrębie komórek kanalików nerkowych.

8. 7. 3. 3. Analiza ekspresji genu *Atox1* oraz lokalizacji białka *ATOX1* w nerkach mutantów *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 6 miesięczne

Analizy ekspresji genu *Atox1* w nerkach pochodzących od 6 miesięcznych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 wykazały, że poziom ekspresji badanego genu był niższy zarówno w porównaniu do osobników kontrolnych, jak i osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) (Wyk. 19). Wysoki poziom

zawartości miedzi w nerkach 6 miesięcznych mutantów *mosaic* utrzymuje się pomimo zaprzestania terapii chlorkiem miedzi (II), a stężenie miedzi w nerkach jest wręcz toksyczne, co potwierdzają wyniki analizy histologicznej nerek (Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz 2011). U myszy mutantów obniżenie poziomu ekspresji genu *Atox1*, tak jak w przypadku pozostałych grup mutantów *mosaic* poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II), spowodowane jest bardzo wysokim stężeniem jonów miedzi w obrębie nerek. W nerkach 6 miesięcznych mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) zbyt wysokie i jednocześnie długotrwałe działanie wysokiego stężenia miedzi wywołane zaburzonym metabolizmem tego pierwiastka, związanego z brakiem funkcjonalnego białka ATP7A, prowadzi do zaburzeń procesów przeciwdziałających negatywnym skutkom działania stresu oksydacyjnego.

W przypadku nerek pochodzących od 6 miesięcznych myszy mutantów *mosaic* poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) spadek ekspresji genu *Atox1* ma najprawdopodobniej podłoże podobne do tego jaki obserwuje się w przypadku 14-dniowych oraz 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , a także w wątrobie pochodzącej od psów pozbawionych funkcjonalnego białka COMMD1 (Favier i wsp. 2015). Zakumulowana miedź w obrębie komórek nerek 6 miesięcznych mutantów osiąga poziom wysoce toksyczny, przez co w tych komórkach najprawdopodobniej produkowane są ogromne ilości wolnych rodników uszkadzających struktury błon komórkowych, co skutkuje zaburzeniem budowy oraz funkcji kanalików nerkowych.

Przeprowadzone analizy lokalizacji białka ATOX1 w komórkach kanalików nerkowych nie wykazały zmian w porównaniu do analiz przeprowadzonych w grupie osobników kontrolnych (Fot. 23C). W nerkach pochodzących od 6 miesięcznych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 białko ATOX1 zlokalizowane jest w cytoplazmie, jednak nie ulega ono relokalizacji do jądra komórkowego. Tym samym białko ATOX1 w komórkach kanalików nerkowych w nerkach 6 miesięcznych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 pełni głównie rolę metalochaperonu jonów miedzi. Równocześnie wyniki te mogą świadczyć o tym, że podobnie, jak w przypadku 6 miesięcznych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , również u osobników tej grupy badanej obserwowane w nerkach zmiany proliferacji komórek powstają na drodze innej niż poprzez indukcję ekspresji cykliny D1 przez białko ATOX1.

8. 8. Analiza wpływu stosowanej terapii chlorkiem miedzi (II) na ekspresję genu i białka Ccs/CCS, także aktywność białka SOD1 w nerkach

W komórkach białko CCS zlokalizowane jest głównie w obrębie cytoplazmy, a także stwierdzono jego obecność w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium (Crapo i wsp. 1992, Field i wsp. 2003, Kawamata i Manfredi 2008). Jest ono największym z poznanych dotąd metalochaperonów. Składa się z trzech domen, z których każda pełni odrębną funkcję związaną z transportem jonów miedzi do białka docelowego, którym jest dysmutaza ponadtlenkowa SOD1 (Bartnikas i wsp. 2000, Palumaa 2013, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004, Wong i wsp. 2000). Badania nad ekspresją genu i białka *Ccs/CCS* wykazały, że ekspresja białka CCS jest regulowana przez poziom miedzi w komórkach, natomiast ekspresja genu *Ccs* nie podlega takiej regulacji (Bertinato i L'Abbé 2003, Prohaska i wsp. 2003a). Jak wykazały wyniki licznych badań nawet niewielkie obniżenie stężenia miedzi może wywoływać znaczący wzrost poziomu ekspresji białka CCS, natomiast wzrost zawartości miedzi w komórkach wpływa na obniżenie poziomu ekspresji białka CCS poprzez jego degradację (Bertinato i L'Abbé 2003, Bertinato i wsp. 2010, Caruano-Yzermans i wsp. 2006, Dong i wsp. 2014, Prohaska i wsp. 2003a, West i Prohaska 2004). Zaproponowano również mechanizm degradacji białka CCS. Otóż wzrost stężenia jonów miedzi sprzyja wiązaniu jonów tego metalu przez białko CCS, co prowadzi do zmian konformacyjnych białka. Jak wykazano białko CCS, które związało jony miedzi jest bardziej narażone na degradację przy udziale dużej podjednostki 26S proteasomu. Przy niskim poziomie jonów miedzi w komórce białko CCS tworzy stabilny heterodimer z białkiem SOD1 (CCS-SOD1). Jest to możliwe dzięki bardzo wysokiej homologii II domeny białka CCS oraz białka SOD1.

Białko CCS nie tylko dostarcza i pośredniczy w przekazaniu jonów miedzi do SOD1, ale również bierze udział w aktywacji białka SOD1, podczas którego następuje utworzenie wiązania dwusiarczkowego pomiędzy cysteiną-224 białka CCS oraz cysteiną-57 białka SOD1, co prowadzi do utworzenia heterodimeru (Antinone i wsp. 2017, Furukawa i O'Halloran 2006). Ponadto badania prowadzone na tkankach pochodzących od zwierząt z wyłączonym genem *Ccs* (knockout genu *Ccs*) odnotowano wyraźny spadek aktywności białka SOD1 (Wong i wsp. 2000). Badania te wykazały, że białko CCS jest niezbędne dla procesu aktywności katalitycznej białka SOD1.

Ekspresję genu i białka *Ccs/CCS*, a także ekspresję białka SOD1 stwierdzono w nerkach u wszystkich grup badanych zwierząt. W obecnej pracy badano poziom ekspresji genu oraz białka *Ccs/CCS* w nerkach pochodzących od myszy o genotypie dzikim oraz

mutantów *mosaic* (Fot. 25, Wyk. 20-22). Wykazano również, jak zmiana ekspresji białka CCS wpływa na aktywność białka SOD1 (Ryc. 11-13).

8. 8. 1. Analiza ekspresji genu oraz białka Ccs/CCS, a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach osobników 14-dniowych

Przeprowadzono analizy mające na celu zbadanie czy podawanie chlorku miedzi (II) w początkowym okresie życia ma wpływ na zmianę ekspresji genu oraz białka *Ccs/CCS*, a także na aktywność białka SOD1 w nerkach myszy 14-dniowych.

8. 8. 1. 1. Analiza ekspresji genu oraz białka Ccs/CCS, a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ – osobniki 14-dniowe

Przeprowadzone metodą real time PCR analizy ekspresji genu *Ccs* w nerkach pochodzących od 14-dniowych myszy poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) nie wykazały zmian w porównaniu do poziomu ekspresji badanego genu u osobników kontrolnych (Wyk. 20). Podobne wyniki potwierdzające brak zmian w poziomie ekspresji genu *Ccs* w nerkach, wątrobie oraz mózgu pochodzących od myszy młodych wykazano również w badaniach przeprowadzonych na myszach i szczurach laboratoryjnych, które karmione były pokarmem o wysokiej zawartości miedzi (Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004). Brak zmian poziomu ekspresji genu *Ccs* potwierdzono również w badaniach *in vitro*, które przeprowadzono na ludzkiej linii komórek śródbłona żyły pępkowej (HUVEC; ang. *human umbilical vein endothelial cells*), hodowanych w medium o wysokim stężeniu jonów miedzi (Dong i wsp. 2014).

Ilościowe analizy ekspresji białka CCS w nerkach badanych myszy młodych zostały wykonane za pomocą metody Western blot. U myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ analizy te wykazały spadek poziomu ekspresji badanego białka w porównaniu do zwierząt grupy kontrolnej (Ryc. 8). U badanych 14-dniowych osobników o genotypie dzikim, pomimo suplementacji CuCl₂, zawartość miedzi w nerkach była porównywalna z osobnikami kontrolnymi (Wyk. 8). Miedź pochodzącą z dootrzewnowej iniekcji CuCl₂ zmagazynowana zostaje w wątrobie, jednak wraz z krwią dociera ona również do nerek, gdzie ulega procesom filtracji i ponownej reabsorpcji w komórkach kanalików nerkowych. W nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) pierwiastek ten nie ulega akumulacji i jest w sposób ciągły przekazywany do krwi, o czym może świadczyć lokalizacja białka ATP7A w błonie bazolateralnej komórek

kanalików nerkowych w nerkach tych zwierząt (Lenartowicz i wsp. 2012a). Proces transportu miedzi w komórkach kanalików nerkowych samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 jest bardzo dynamiczny i najprawdopodobniej nasilony, co może wpływać na obniżenie poziomu ekspresji białka CCS. Jest to zgodne z danymi pochodzącymi z literatury wskazującymi, że pod wpływem wysokiego stężenia jonów miedzi białko CCS ulega degradacji (Bertinato i L'Abbé 2003, Bertinato i wsp. 2010). Potwierdzają to również wyniki badań przeprowadzonych na zwierzętach, które karmione były dietą z wysoką zawartością miedzi. U badanych myszy i szczurów zaobserwowano spadek poziomu białka CCS w wątrobie, nerkach oraz mózgu (Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004). Również wyniki badań przeprowadzonych *in vitro* potwierdzają, że wysokie stężenie miedzi prowadzi do spadku ekspresji białka CCS. Badania przeprowadzone na komórkach HUVEC, jak i mysich, zarodkowych fibroblastach, hodowanych w pożywce zawierającej wysokie stężenie tego pierwiastka zaobserwowano spadek ekspresji białka CCS (Caruano-Yzermans i wsp. 2006, Dong i wsp. 2014).

Przedstawione w obecnej pracy wyniki mogą świadczyć o tym, że pomimo braku akumulacji jonów miedzi ich transport z moczu pierwotnego do naczyń krwionośnych w obrębie komórek kanalików nerkowych jest nasilony, co najprawdopodobniej przyczynia się do degradacji białka CCS. Jak wykazały badania, nawet bardzo niewielkie zmiany stężenia jonów miedzi w komórkach mogą prowadzić do obniżenia ekspresji białka CCS, co świadczy o tym, że białko to jest bardzo wrażliwe na zmiany stężenia jonów miedzi (Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004).

Nerka należy do organów odznaczających się wysoką aktywnością metaboliczną, dlatego też wymaga zwiększonego zapotrzebowania oraz aktywności białek chroniących przed negatywnym działaniem stresu oksydacyjnego (Beers i wsp. 1997, Casareno i wsp. 1998, Cobine i wsp. 2006, Culotta i wsp. 1997, Glerum i wsp. 1996, Maxfield i wsp. 2004, Rae i wsp. 1999). Katalityczna aktywność dysmutazy ponadtlenkowej jest zależna od organu, co związane jest z nasileniem procesów metabolicznych zachodzących w obrębie różnych organów (Rossi i wsp. 1994). Przeprowadzone analizy poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach 14-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 nie wykazały różnic w porównaniu do wyników uzyskanych w grupie osobników kontrolnych (Ryc. 11). Wyniki te sugerują, że dostarczane do organizmu dodatkowej ilości miedzi pozwala na zachowanie prawidłowej aktywności białka SOD1 w nerkach 14-dniowych myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 . Wpływ podania związków miedzi na wzrost poziomu białka SOD1 w erytrocytach obserwowano wcześniej u 14-dniowych

samców o genotypie dzikim poddanych iniekcji CuCl_2 , jednak u tych zwierząt nie przeprowadzono analiz poziomu ekspresji białka CCS (Lenartowicz i wsp. 2017). Przedstawione w obecnej pracy wyniki wskazują, że spadek poziomu ekspresji białka CCS w nerkach badanych samców nie jest równoznaczny z obniżeniem poziomu aktywności białka SOD1, co może sugerować, że istnieje, nieznan dotąd, alternatywny mechanizm włączania jonów miedzi do cząsteczek SOD1, na drodze niezależnej od białka CCS (Leitch i wsp. 2009a). Przypuszczenia te wymagają jednak przeprowadzenia dodatkowych badań.

8. 8. 1. 2. Analiza ekspresji genu oraz białka Ccs/CCS, a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach mutantów *mosaic* ($\text{Atp7a}^{\text{mo-ms}}$) niepoddanych terapii CuCl_2 – osobniki 14-dniowe

Zawartość miedzi w nerkach 14-dniowych mutantów *mosaic* jest znacznie wyższa w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 8). Przeprowadzone analizy poziomu ekspresji genu *Ccs* w nerkach mutantów *mosaic* nie wykazały statystycznie istotnych różnic w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 20). Co wskazuje, że wzrost poziomu zawartości miedzi w komórkach nerki samców mutantów *mosaic* nie wpływa na zmiany poziomu ekspresji badanego genu. Podobne wyniki uzyskano analizując ekspresję genu *Ccs* w nerkach, wątrobie oraz mózgu zwierząt, które otrzymywały dietę o wysokiej zawartości miedzi (Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004).

Przeprowadzone za pomocą metody Western blot ilościowe analizy poziomu ekspresji białka CCS wykazały spadek ekspresji badanego białka w nerkach 14-dniowych mutantów *mosaic* (Ryc. 8). Wyniki te są zgodne z wynikami badań *in vitro* oraz *in vivo* wskazującymi, że wzrost poziomu miedzi prowadzi do obniżenia ekspresji białka CCS (Bertinato i L'Abbé 2003, Bertinato i wsp. 2010, Caruano-Yzermans i wsp. 2006, Dong i wsp. 2014). Przeprowadzone w obecnej pracy analizy dotyczące ekspresji poziomu białka CCS po raz pierwszy pokazały, jak zmienia się on u myszy z wrodzonym defektem w metabolizmie miedzi wywołanym brakiem aktywnego białka ATP7A. Przeprowadzone w obecnej pracy badania są pierwszą próbą analizy ekspresji białka CCS w przypadku patologicznym u myszy uznanych za zwierzęcy model choroby Menkesa u człowieka. Wcześniejsze badania prowadzone były na zwierzętach, u których nadmiar bądź niedobór miedzi spowodowany był odpowiednio dobraną dietą (Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004). Wyniki takich badań wykazały, że w nerkach, wątrobie oraz mózgu myszy oraz szczurów otrzymujących pokarm bogaty w miedź poziom ekspresji białka CCS był znacznie obniżony (Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004). Degradację

białka CCS pod wpływem wysokiego stężenia jonów miedzi potwierdzono również w badaniach przeprowadzonych przez Bertinato i L'Abbes w 2003 roku. Badania te wykazały, że w linii komórek H4IIE nowotworu wątroby szczura hodowanych w medium o wysokim stężeniu jonów miedzi obserwowano bardzo szybką degradację białka CCS w tych komórkach (Bertinato i L'Abbé 2003).

W nerkach 14-dniowych mutantów *mosaic* miedź, która zostaje zabsorbowana z moczu pierwotnego do komórek kanalików nerkowych przy udziale białka CTR1 wpływa na degradację białka CCS. Obniżenie poziomu ekspresji białka CCS w komórkach nerek mutantów *mosaic* skutkuje obniżeniem aktywności białka SOD1 w nerkach 14-dniowych mutantów *mosaic* w porównaniu do osobników kontrolnych (Ryc. 11). Wyniki te sugerują, że obniżenie aktywności białka SOD1 w nerkach tych zwierząt związane jest z degradacją białka CCS w wyniku wysokiego, wewnątrzkomórkowego stężenia jonów miedzi. Obniżenie aktywności białka SOD1 w nerkach myszy mutantów może przyczyniać się do zwiększonej podatności tego organu na uszkodzenia wywołane akumulowaniem jonów miedzi w komórkach kanalików nerkowych. U 14-dniowych mutantów *mosaic* niepoddanych terapii, obniżenie ekspresji i aktywności białka SOD1 stwierdzono również w komórkach erytrocytów krwi obwodowej (Lenartowicz i wsp. 2014). Jednak w tym przypadku obniżenie aktywności białka SOD1 spowodowane było niską zawartością jonów miedzi w tych komórkach, gdyż przy braku miedzi dysmutaza nadtlenkowa w formie apo-SOD1 jest znacznie szybciej degradowana w porównaniu do formy holo-SOD1, zawierającej jony miedzi (Prohaska i wsp. 2003b).

8. 8. 1. 3. Analiza ekspresji genu oraz białka Ccs/CCS, a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach mutantów mosaic (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych terapii CuCl₂ – osobniki 14-dniowe

W nerkach 14-dniowych mutantów *mosaic* w wyniku stosowanej u tych zwierząt terapii chlorkiem miedzi (II) zawartości miedzi zakumulowanej w obrębie nerek jest aż 12-krotnie wyższa w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 8). Podobnie, jak w przypadku pozostałych badanych grup przeprowadzone analizy poziomu ekspresji genu *Ccs* w nerkach mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl₂ nie wykazały różnic w porównaniu do osobników kontrolnych, co potwierdza, że zawartość miedzi w komórkach nerek nie wpływa na poziom mRNA dla genu *Ccs* (Wyk. 20). Wyniki takich badań potwierdzono również w cytowanych wcześniej badaniach *in vitro* oraz *in vivo* (Dong i wsp. 2014, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004). Przeprowadzone analizy ilościowe

poziomu ekspresji białka CCS w nerkach zwierząt tej grupy badanej wykazały spadek ekspresji badanego białka w porównaniu do osobników grupy kontrolnej (Ryc. 8). Wynik ten potwierdza wcześniejsze doniesienia o degradacji białka CCS pod wpływem wysokiego stężenia miedzi (Bertino i L'Abbé 2003, Bertinato i wsp. 2010, Dong i wsp. 2014, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004).

Ponadto w nerkach tych zwierząt obserwuje się, podobnie jak u mutantów *mosaic* niepoddanych terapii CuCl_2 spadek aktywności białka SOD1 w porównaniu do osobników grupy kontrolnej (Ryc. 11). Spadek poziomu aktywności białka SOD1 może być spowodowany brakiem włączania jonów miedzi do formy apo-SOD1 oraz brakiem aktywacji SOD1 przez białko CCS, które w wyniku działania wysokiego stężenia miedzi ulega degradacji. Jak wykazano bowiem, u myszy z knockoutem genu *Ccs*, brak białka CCS prowadził do znacznego obniżenia aktywności białka SOD1 w nerkach takich osobników (Wong i wsp. 2000). Przedstawione w obecnej pracy wyniki wykazały jednak wzrost poziomu aktywności białka SOD1 u samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 w porównaniu do samców mutantów niepoddanych terapii (Ryc. 11). Wcześniejsze wyniki badań przeprowadzonych na komórkach erytrocytów 14-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 wykazały wzrost poziomu ekspresji białka SOD1 w tych komórkach. Również przeprowadzone przez L. Rossi i współautorów badania na supernatantach ekstraktów wątroby odznaczającej się niską zawartością miedzi, wykazały, że pod wpływem stosowanej inkubacji hepatocytów w środowisku z wysokim stężeniem jonów miedzi, poziom aktywności białka SOD1 w tych komórkach wzrastał (Rossi i wsp. 1994). Wyniki te oraz wyniki przedstawione w obecnej pracy mogą sugerować, że wzrost poziomu aktywności białka SOD1 w nerkach mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 może być spowodowany dostarczeniem dodatkowej ilości miedzi poprzez podawanie iniekcji CuCl_2 pomimo spadku ekspresji białka CCS. Wyniki te mogą sugerować, że prawdopodobnie istnieje jeszcze inny, alternatywny mechanizm molekularny, który pozwala na dostarczenie jonów miedzi do białka SOD1 na drodze niezależnej od białka CCS. Przypuszczenia te mogą potwierdzać badania przeprowadzone na drożdżach (Leitch i wsp. 2009a). Możliwym jest, że w komórkach nerek u myszy mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 został uruchomiony taki mechanizm, jednak te przypuszczenia wymagają przeprowadzenia dalszych analiz.

8. 8. 2. Analiza ekspresji genu oraz białka Ccs/CCS, a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach osobników 46-dniowych

Przeprowadzone analizy z wykorzystaniem nerek pochodzących od myszy 46-dniowych miały na celu sprawdzenie czy podawanie chlorku miedzi (II) przez okres 44 dni w regularnych, 2-dniowych odstępach ma wpływ na zmianę ekspresji genu oraz białka Ccs/CCS, a także na aktywność białka SOD1.

8. 8. 2. 1. Analiza ekspresji genu oraz białka Ccs/CCS, a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ – osobniki 46-dniowe

W nerkach 46-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II), pomimo dodatkowej ilości miedzi dostarczanej w postaci iniekcji CuCl₂, poziom tego pierwiastka jest podobny, do tego który stwierdzono u osobników grupy kontrolnej (Wyk. 9). Wiąże się to z aktywnością białka ATP7A, które umożliwia transport jonów miedzi z komórek nabłonkowych kanalików nerkowych do krwioobiegu.

Analizy poziomu ekspresji genu *Ccs* w nerkach pochodzących od 46-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) nie wykazały różnic statystycznie istotnych w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 21). Potwierdza to, że ekspresja genu *Ccs* w nerkach nie jest regulowana przez poziom miedzi w komórkach kanalików nerkowych. Podobne wyniki otrzymano w opisanych wcześniej badaniach *in vitro* i *in vivo* (Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004).

Przeprowadzone ilościowe analizy ekspresji białka CCS w nerkach osobników pochodzących od 46-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ wykazały spadek poziomu ekspresji badanego białka w porównaniu do osobników kontrolnych (Ryc. 9). Wyniki badań przeprowadzone na 56-dniowych myszach oraz 49-dniowych szczurach, które przez odpowiednio 5 i 4 tygodni otrzymywały pokarm bogaty w miedź oraz charakteryzowały się ogólnoustrojowym nadmiarem jonów miedzi, stwierdzono spadek ekspresji CCS w nerkach, wątrobie oraz mózgu tych zwierząt (Lassi i Prohaska 2012). Podobne wyniki badań uzyskano analizując poziom ekspresji białka CCS w erytrocytach 4 miesięcznych szczurów, które poczynając od 31 dnia życia otrzymywały przez kolejne 13 tygodni pokarm bogaty w miedź (Bertinato i wsp. 2010). Wszystkie te wyniki wskazują, że pod wpływem wysokiego stężenia jonów miedzi w komórkach badanych zwierząt dochodzi do degradacji białka CCS. Prawdopodobnie u 46-dniowych samców o genotypie dzikim

poddanych suplementacji CuCl_2 , podobnie jak u 14-dniowych myszy o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , w wyniku nasilonego transportu jonów miedzi w obrębie komórek kanalików nerkowych dochodzi do degradacji białka CCS.

W nerkach 46-dniowych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) stwierdzono również spadek poziomu aktywności białka SOD1 (Ryc. 12). Prawdopodobnie obniżenie aktywności SOD1 spowodowane jest degradacją białka CCS, co prowadzi do obniżenia poziomu metalacji formy apo-SOD1 oraz skutkuje brakiem aktywacji białka SOD1. Należy zaznaczyć, że u młodych myszy 14-dniowych o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , nie zaobserwowano obniżenia aktywności białka SOD1, pomimo degradacji białka CCS, co wskazuje, że obserwowany spadek aktywności SOD1 u myszy 46-dniowych o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 zależy od czasu ekspozycji komórek nerek na wysokie stężenie jonów miedzi. U zwierząt 46-dniowych procesy nasilonego transportu jonów miedzi w obrębie komórek kanalików nerkowych trwają znacznie dłużej niż w przypadku młodych, 14-dniowych myszy, co skutkuje degradacją białka CCS w komórkach kanalików nerkowych u myszy 46-dniowych poddanych suplementacji CuCl_2 .

8. 8. 2. 2. Analiza ekspresji genu oraz białka Ccs/CCS, a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach mutantów mosaic (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych terapii CuCl_2 – osobniki 46-dniowe

W komórkach nerek pochodzących od 46-dniowych samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 poziom zawartości miedzi w nerkach jest 12-krotnie wyższy w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 9). Przeprowadzone analizy ekspresji genu *Ccs* w nerkach pochodzących od zwierząt tej grupy badanej nie wykazały różnic statystycznie istotnych w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 21). Wyniki takich badań potwierdzono również w cytowanych wcześniej badaniach *in vitro* oraz *in vivo* (Dong i wsp. 2014, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004).

Równocześnie za pomocą metody Western blot przeprowadzono ilościowe analizy ekspresji białka CCS w nerkach pochodzących od 46-dniowych samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , które wykazały aż 4-krotny spadek poziomu ekspresji badanego białka w porównaniu do zwierząt grupy kontrolnej (Ryc. 9). Przedstawione w obecnej pracy wyniki świadczą o wpływie wysokiego stężenia jonów miedzi na degradację białka CCS w obrębie komórek kanalików nerkowych nerek 46-dniowych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 . Równocześnie wyniki te potwierdzają wcześniejsze doniesienia, o degradacji

białka CCS pod wpływem działania wysokiego stężenia jonów miedzi (Bertinato i L'Abbé 2003, Bertinato i wsp. 2010, Dong i wsp. 2014, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004).

Dotychczas jednak przeprowadzono bardzo niewiele badań dotyczących poziomu ekspresji białka CCS w stanach patologicznych. Obniżenie ekspresji białka CCS obserwowano również u chorych psów rasy *Labrador retriever* cierpiących na zapalenie wątroby wywołane nadmiernym odkładaniem jonów miedzi. U takich psów poziom białka CCS w erytrocytach krwi obwodowej był znacznie niższy niż u zwierząt zdrowych (Dirksen i wsp. 2016). W większości przypadków eksperymenty dotyczące analizy ekspresji białka CCS prowadzone były głównie na zwierzętach karmionych pokarmem wzbogaconym w dodatkową zawartość miedzi. Pomimo ogólnoustrojowego nadmiaru miedzi nie opisano procesów patologicznych, jednak poziom ekspresji białka CCS był u nich znacznie obniżony w porównaniu do osobników karmionych standardową dietą (Bertinato i L'Abbé 2003, Bertinato i wsp. 2010, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004). Podobne analizy przeprowadzono również na szczurach z wysoką zawartością miedzi w wątrobie, u których poziom ekspresji białka CCS w erytrocytach był 2-krotnie niższy w porównaniu do osobników o niskiej zawartości miedzi w wątrobie (Bertinato i wsp. 2010).

Przeprowadzone analizy w nerkach pochodzących od 46-dniowych samców mutantów poddanych terapii chlorkiem miedzi (II) wykazały prawie 3-krotny spadek poziomu aktywności białka SOD1 w porównaniu do osobników kontrolnych, co może wiązać się ze znacznym spadkiem ekspresji białka CCS (Ryc. 12). Taki spadek ekspresji białka SOD1 może prowadzić do znacznego obniżenia ochrony antyoksydacyjnej komórek nerki.

8. 8. 3. Analiza ekspresji genu oraz białka Ccs/CCS, a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach osobników 6 miesięcznych

Przeprowadzone analizy w nerkach myszy 6 miesięcznych o genotypie dzikim oraz mutantów *mosaic*, które w ciągu pierwszych 44 dni życia otrzymywały iniekcję chlorku miedzi (II), miało na celu sprawdzenie długotrwałego efektu suplementacji CuCl_2 na zmianę poziomu ekspresji genu oraz białka *Ccs/CCS*. W nerkach 6 miesięcznych myszy przeprowadzono również badania aktywności białka SOD1.

8. 8. 3. 1. Analiza ekspresji genu oraz białka Ccs/CCS, a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ – osobniki 6 miesięczne

Zawartości miedzi w nerkach osobników 6 miesięcznych, które przez okres pierwszych 44 dni życia były poddane suplementacji chlorkiem miedzi (II) jest porównywalny do tego, który jest obserwowany u osobników kontrolnych, co wskazuje, że u myszy tych transport jonów miedzi w obrębie nerek zachodzi w sposób prawidłowy (Wyk. 10).

Podobnie, jak w przypadku myszy 14-dniowych oraz 46-dniowych o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂, również u samców 6 miesięcznych przeprowadzone analizy poziomu ekspresji genu *Ccs* w nerkach tych zwierząt nie wykazały różnic statystycznie istotnych w porównaniu do osobników o genotypie dzikim, co potwierdza, że ekspresja tego genu w nerkach na poziomie transkrypcji nie jest regulowana przez stężenie jonów miedzi (Wyk. 22).

Przeprowadzone analizy poziomu ekspresji białka CCS w nerkach 6 miesięcznych osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl₂ nie wykazały zmian w porównaniu do osobników kontrolnych (Ryc. 10). Również poziom aktywności białka SOD1 w nerkach osobników o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) był porównywalny z obserwowanym wynikiem u osobników kontrolnych (Ryc. 13). Otrzymane wyniki mogą wskazywać, że w nerkach u tych 6 miesięcznych samców pomimo suplementacji chlorkiem miedzi (II) przez okres pierwszych 44 dni życia nie dochodzi do zmiany ekspresji badanych genów i białek. Potwierdza to, że występujące u tych zwierząt w pełni funkcjonalne białko ATP7A pozwala na prawidłowe przeprowadzenie procesów reabsorpcji jonów miedzi z moczu, a tym samym na utrzymanie homeostazy tego pierwiastka w nerkach.

8. 8. 3. 2. Analiza ekspresji genu oraz białka Ccs/CCS, a także ekspresji i aktywności białka SOD1 w nerkach mutantów mosaic (*Atp7a^{mo-ms}*) poddanych terapii CuCl₂ – osobniki 6 miesięczne

Zawartość miedzi w nerkach 6 miesięcznych samców mutantów *mosaic*, które zostały poddane terapii chlorkiem miedzi (II) przez pierwszy 44 dni życia była znacznie wyższa w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 10). Akumulacja miedzi w nerkach tych zwierząt związana jest z brakiem aktywnie działającego białka ATP7A w komórkach kanalików nerkowych, co uniemożliwia reabsorpcję pobranych z moczu pierwotnego jonów

metalów do naczyń krwionośnych otaczających kanaliki (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz i wsp. 2014, Lenartowicz i wsp. 2017).

Analizy poziomu ekspresji genu *Ccs* w nerkach 6 miesięcznych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 nie wykazały różnic statystycznie istotnych w porównaniu do osobników kontrolnych (Wyk. 22). Wyniki badań przeprowadzonych w modelach *in vitro* oraz *in vivo* również nie wykazały zmian w poziomie ekspresji genu *Ccs* pod wpływem działania wysokiego stężenia miedzi (Dong i wsp. 2014, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004).

Z kolei przeprowadzone ilościowe analizy wykonane za pomocą metody Western blot wykazały wzrost poziomu ekspresji białka CCS w nerkach tych zwierząt w porównaniu do osobników o genotypie dzikim (Ryc. 10). U myszy tych brak podaży miedzi z pominięciem bariery jelita w postaci podskórnych iniekcji chlorku miedzi (II) powoduje iż zaczynają one rozwijać ogólnoustrojowy niedobór miedzi manifestujący się obniżeniem poziomu tego pierwiastka w wątrobie oraz osoczu, jak również w komórkach erytrocytów (Lenartowicz i wsp. 2017). Jak już wcześniej wspomniano, miedź dostarczana do organizmu 6 miesięcznych samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 pochodzi jedynie z pokarmu, jednak w wyniku braku aktywności białka ATP7A jony miedzi zostają związane w komórkach jelita, co u tych zwierząt skutkuje ogólnoustrojowym niedoborem miedzi (Lenartowicz i Sasuła 2000, Lenartowicz i wsp. 2001, Lenartowicz i wsp. 2010b, Lenartowicz 2011, Lenartowicz i wsp. 2012a, Lenartowicz i wsp. 2017). Należy również przypuszczać, że u tych zwierząt dochodzi również do obniżenia zawartości miedzi w moczu pierwotnym. Jak wykazały wyniki badań przeprowadzonych w obecnej pracy, myszy te starają się odzyskać miedź z moczu pierwotnego, poprzez obserwowaną, wyraźną lokalizację białka CTR1 w błonach apikalnych kanalików nerkowych. W nerkach samców mutantów *mosaic* jony miedzi pobrane z moczu pierwotnego zostają zakumulowane w komórkach kanalików proksymalnych, natomiast w dalszych odcinkach nefronów może występować niedobór tego pierwiastka, na co może wskazywać wysoki poziom ekspresji białka CTR1 i jego lokalizacja w błonie bazalnej komórek pętli Henlego w rdzeniu nerek (Fot. 14C). Można przypuszczać, że w komórkach wykazujących niedobór miedzi dochodzi do podniesienia poziomu ekspresji białka CCS, gdyż jak wykazano wcześniej, wzrost ekspresji białka CCS stwierdzono nawet przy bardzo nieznacznym obniżeniu zawartości miedzi w komórkach. Tym samym białko CCS uznano za marker wskazujący na niedobór miedzi w organizmie (Lassi i Prohaska 2012, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b West i Prohaska 2004). Potwierdzają to

badania prowadzone na zwierzętach, które otrzymywały pokarm o obniżonej zawartości miedzi. U takich zwierząt stwierdzono wzrost poziomu ekspresji białka CCS w nerkach, wątrobie oraz mózgu (Lassi i Prohaska 2012, Prohaska i wsp. 2003a, Prohaska i wsp. 2003b, West i Prohaska 2004). Wzrost ekspresji białka CCS u 6 miesięcznych mutantów *mosaic* może wskazywać, że postępuje u nich ogólnoustrojowy niedobór miedzi, który dotyczy również komórek nerek.

Wykonane analizy aktywności białka SOD1 w nerkach 6 miesięcznych mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 nie wykazały różnic w porównaniu do osobników o genotypie dzikim (Ryc. 13). Przeprowadzone badania mogą wskazywać, że u 6 miesięcznych mutantów *mosaic* występują procesy mające na celu ochronę komórek nerek przed negatywnym działaniem stresu oksydacyjnego, a w których udział bierze aktywne białko SOD1.

9. Wnioski

Myszy mutanty *mosaic* (*Atp7a^{mo-ms}*) uznawane są jako zwierzęcy model choroby Menkesa. U myszy tych, podobnie jak i u pacjentów z chorobą Menkesa, mutacja w obrębie genu *Atp7a/ATP7A*, zlokalizowanego na chromosomie X, prowadzi do zaburzeń metabolizmu miedzi. Mutacja *mosaic* jest letalna i prowadzi do śmierci samców mutantów pomiędzy 15, a 17 dniem życia. Podanie samcom mutantom *mosaic* iniekcji roztworu chlorku miedzi (II) z pominięciem bariery jelitowej znosi letalne skutki mutacji i prowadzi do redukcji części objawów patologicznych. Zarówno u pacjentów z chorobą Menkesa, jak również u myszy mutantów *mosaic*, stosowanie terapii związkami miedzi prowadzi do akumulacji miedzi w nerkach, co skutkuje nieodwracalnym uszkodzeniem struktury oraz funkcji tego organu. W obecnej pracy przeprowadzono badania mające na celu poznanie nowych mechanizmów molekularnych, które rozwijają się w nerkach mutantów *mosaic* w odpowiedzi na zastosowanie terapii polegającej na podawaniu badanym mutantom iniekcji roztworu chlorku miedzi (II). Przedstawione w obecnej pracy wyniki badań nad wpływem nadmiaru miedzi na procesy zachodzące w nerkach samców mutantów *mosaic* oraz samców, u których nie wystąpiła mutacja w genie *Atp7a*, pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

1. Podawanie chlorku miedzi (II), począwszy od 2 do 44 dnia życia, samcom mutantom *mosaic*, redukuje letalne skutki mutacji oraz łagodzi występowanie objawów patologicznych. U mutantów poddanych terapii nie obserwowano charakterystycznych zaburzeń neurologicznych, takich jak drgawki, drżenia, niedowład tylnych kończyn. Masa ciała u samców mutantów *mosaic* poddanych terapii była porównywalna do tej obserwowanej u osobników o genotypie dzikim. U myszy o genotypie dzikim, które poddane zostały suplementacji chlorkiem miedzi (II), odnotowano wyraźny wzrost masy ciała, w porównaniu do grupy samców kontrolnych.

2. Suplementacja chlorkiem miedzi (II) u myszy o genotypie dzikim prowadzi do akumulacji miedzi w wątrobie, co związane jest z oszczędną gospodarką tego pierwiastka u młodych myszy. W wątrobie zwierząt dorosłych, 46-dniowych oraz 6 miesięcznych o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , zawartości miedzi jest podobna jak u osobników kontrolnych. U tych zwierząt miedź dostarczana jest wraz z pokarmem, przez co nie zachodzi konieczność jej akumulacji w wątrobie. U myszy mutantów *mosaic* podawanie iniekcji CuCl_2 na wczesnych etapach życia postnatalnego pozwala na nieznaczne uzupełnienie zapasów miedzi w wątrobie, jednak zawartość tego pierwiastka jest znacznie niższa niż u osobników

kontrolnych. Jednak stosowanie długotrwałej i systematycznej iniekcji chlorkiem miedzi (II) pozwala na dostarczenie dostatecznej ilości tego pierwiastka, aby zredukować objawy patologiczne wywołane brakiem aktywności białka ATP7A. Zaprzeszanie podawania chlorku miedzi (II) samcom mutantom *mosaic* prowadzi u nich w końcu do wyczerpania zapasów tego pierwiastka zgromadzonych w wątrobie.

3. Przeprowadzone analizy poziomu zawartości miedzi w nerkach wykazały, że w przypadku samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji CuCl_2 , zawartość tego pierwiastka zarówno u młodych (14-dniowych), jak i u myszy dorosłych (46-dniowych oraz 6 miesięcznych) była podobna jak u osobników kontrolnych. Otrzymane wyniki wskazują, że poziom ten zależny jest od prawidłowo funkcjonującego białka ATP7A w obrębie komórek kanalików nerkowych, co pozwala na utrzymanie prawidłowej homeostazy miedzi w nerkach. Natomiast u mutantów *mosaic* brak aktywnego białka ATP7A w komórkach kanalików nerkowych prowadzi do akumulacji miedzi w obrębie nerek. U tych zwierząt miedź dostarczana w postaci iniekcji chlorku miedzi (II) jest absorbowana z moczu pierwotnego do komórek kanalików nerkowych, jednak brak aktywności białka ATP7A uniemożliwia jej transport z komórek kanalików do krwioobiegu.

4. Badania przeprowadzone w obecnej pracy wykazały, że poziom ekspresji genu *Ctrl* w nerkach jest zależny od poziomu zawartości miedzi w tym organie. Wysoka zawartość miedzi w nerkach prowadzi do spadku ekspresji genu *Ctrl*, co wykazano u samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , u których dochodzi do akumulacji miedzi w nerkach. Gen *Ctrl* koduje białko CTR1, które wbudowane w błonę komórkową w formie homotrimeru tworzy kanał dla transportu jonów miedzi. W obecnej pracy po raz pierwszy w badaniach *in vivo* wykazano, że w komórkach kanalików nerkowych białko to jest wbudowane zarówno w błonę apikalną, gdzie uczestniczy w procesie reabsorpcji jonów miedzi z moczu pierwotnego, jak i w błonę bazalną, gdzie bierze udział w pobieraniu jonów miedzi z naczyń krwionośnych na potrzeby metaboliczne komórek nefronów. Ponadto przeprowadzając reakcję kolokalizacji białka CTR1 oraz markerowego białka akwaporyny 1 (AQP1), wykazano, że w obrębie kory nerki białko CTR1 wykazuje ekspresję w komórkach nabłonkowych kanalików proksymalnych. Przy pomocy reakcji immunofluorescencyjnej po raz pierwszy wykazano, że białko to ma również ekspresję w rdzeniu nerki. Badania nad ekspresją białka CTR1 w komórkach kanalików nerkowych wykazały, że jego wewnątrzkomórkowa lokalizacja zmienia się w zależności od stężenia miedzi w nerkach. Wykazano, że w warunkach

podwyższonego stężenia miedzi, wywołanych zaburzeniami w metabolizmie miedzi, a także po zastosowaniu suplementacji chlorkiem miedzi (II), białko CTR1 ulega relokalizacji z błony komórkowej do cytoplazmy komórek kanalików nerkowych, gdzie następnie może ulegać procesom degradacji. Badania przeprowadzone na samcach o genotypie dzikim, wykazały, że w warunkach fizjologicznych białko CTR1 w komórkach kanalików nerkowych, przyjmuje lokalizację zarówno w błonie apikalnej, jak i bazalnej. Taka lokalizacja pozwala na transport jonów miedzi z moczu pierwotnego przez błonę apikalną, a następnie ich późniejszej reabsorpcji do krwioobiegu, a także pozwala na ich transport przez błonę bazalną w celu wykorzystania jonów miedzi na potrzeby metaboliczne komórek nefronów. Badania na samcach o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II) wykazały, że pod wpływem działania wysokiego stężenia miedzi, białko CTR1 ulega relokalizacji z błony komórkowej komórek kanalików nerkowych do cytoplazmy. Jest to mechanizm ochronny przed negatywnym działaniem wysokiego stężenia jonów miedzi na komórki nefronów. U 6 miesięcznych zwierząt o genotypie dzikim, po zakończeniu suplementacji chlorkiem miedzi (II) w 44 dniu życia, białko CTR1 w komórkach kanalików nerkowych przyjmuje ponownie lokalizację zarówno w błonie apikalnej, jak również w błonie bazalnej. Badania przeprowadzone z wykorzystaniem samców mutantów *mosaic* wykazały, że białko CTR1 w komórkach kanalików nerkowych, podobnie jak w przypadku osobników o genotypie dzikim, występuje zarówno w błonie apikalnej, jak i w błonie bazalnej, jednak sygnał immunopozytywny jest w tym przypadku znacznie silniejszy niż u samców o genotypie dzikim. Białko CTR1 w nerkach pochodzących od samców mutantów *mosaic* poddanych terapii CuCl_2 , w wyniku działania wysokiego stężenia jonów miedzi, ulega internalizacji z błony komórkowej kanalików nerkowych do cytoplazmy, gdzie najprawdopodobniej dochodzi do jego degradacji. Po zakończeniu suplementacji chlorkiem miedzi (II) w 44 dniu życia, w komórkach kanalików nerkowych u 6 miesięcznych samców mutantów *mosaic*, białko CTR1 przyjmuje lokalizację zarówno w błonie apikalnej, jak i w błonie bazalnej. Przedstawione w obecnej pracy wyniki wskazują na utworzenie w nerkach mutantów *mosaic* specyficznych mechanizmów komórkowych, które mają na celu ochronę komórek nerek przed nefrotoksycznym działaniem wywołanym działaniem wysokiego stężenia jonów miedzi.

5. Przeprowadzone analizy poziomu ekspresji genu *Ctr2* w nerkach myszy wykazały, że ekspresja tego genu jest zależna od stężenia jonów miedzi. Badania poziomu ekspresji genu *Ctr2* przeprowadzone na osobnikach o genotypie dzikim (zwierzęta 14-dniowe i 46-dniowe)

poddanych suplementacji CuCl_2 wykazały, że pod wpływem działania wysokiego stężenia miedzi poziom ekspresji badanego genu w nerkach ulega obniżeniu. W nerkach dorosłych, 6 miesięcznych zwierząt o genotypie dzikim nie obserwowano zmian w poziomie ekspresji genu *Ctr2*, co związane jest z brakiem dostarczania dodatkowych ilości jonów miedzi do organizmu tych zwierząt. Podobnie poziom ekspresji genu *Ctr2* był również obniżony w nerkach pochodzących zarówno od 14-dniowych, jak i 46-dniowych samców mutantów *mosaic*, u których zawartość miedzi w nerkach była bardzo wysoka. Jednak u dorosłych, 6 miesięcznych mutantów *mosaic*, u których zakończono terapię chlorkiem miedzi (II) w 44 dniu życia, nastąpił znaczny wzrost poziomu ekspresji genu *Ctr2* w nerkach. Najprawdopodobniej u tych myszy zaznacza się już niedobór miedzi w rdzennej części nefronu, a białko CTR2, kodowane przez gen *Ctr2*, może być wykorzystywane do uwalniania jonów miedzi zmagazynowanych w obrębie lizosomów w komórkach wykazujących niedobór tego pierwiastka.

6. Wyniki analiz przedstawione w obecnej pracy wykazały, że ekspresja genu *Atox1* w nerkach myszy zależna jest od stężenia jonów miedzi. Wysokie stężenie jonów miedzi prowadzi do obniżenia ekspresji genu *Atox1*, co wykazano w nerkach samców mutantów *mosaic*. Gen *Atox1* koduje białko ATOX1, które jest cytoplazmatycznym białkiem metalochaperonowym przejmującym jony miedzi od białka CTR1 i transportującym je do aparatu Golgiego, gdzie przekazuje je następnie do białek docelowych, takich jak ATP7A i ATP7B. Pod wpływem działania wysokiego stężenia jonów miedzi białko to może przemieszczać się do jądra komórkowego, gdzie pełni rolę czynnika transkrypcyjnego dla genów *Ccnd1* oraz *Sod3*. Jak wykazały wyniki reakcji immunofluorescencyjnych przeprowadzonych zarówno w warunkach fizjologicznego, jak i w warunkach wysokiego stężenia jonów miedzi, w nerkach u osobników o genotypie dzikim, jak i u samców mutantów *mosaic*, białko ATOX1 zlokalizowane było tylko w obrębie cytoplazmy komórek nabłonkowych kanalików nerkowych. Otrzymane wyniki wskazują, że niezależnie od wysokiego stężenia miedzi w komórkach nerki białko ATOX1 pełni tylko rolę metalochaperonu dla jonów miedzi.

7. Przeprowadzone badania na myszach o genotypie dzikim oraz samcach mutantach *mosaic* wykazały, że zmiany poziomu zawartości miedzi w nerkach myszy, nie wpływają na zmianę ekspresji genu *Ccs*. Białko CCS jest metalochaperonem transportującym jony miedzi i pośredniczącym w ich przyłączaniu do białka apo-SOD1. W obecnej pracy po raz pierwszy

przeprowadzono badania *in vivo* nad ekspresją białka CCS w nerkach u myszy, zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i warunkach patologicznych. Jak wynika z przeprowadzonych badań, zmiany zawartości miedzi w nerkach wpływają na zmiany poziomu ekspresji białka CCS, co prowadzi również do zmiany poziomu aktywności białka SOD1. Wykazano, że u samców o genotypie dzikim poddanych suplementacji chlorkiem miedzi (II), pod wpływem działania wysokiego stężenia jonów miedzi dochodzi do obniżenia poziomu ekspresji białka CCS w nerkach, gdyż jak wykazano we wcześniejszych badaniach, białko to jest niezwykle wrażliwe na zmiany stężenia jonów miedzi w komórkach i pod wpływem wysokiego stężenia jonów miedzi ulega ono degradacji. Obniżenie ekspresji białka CCS w nerkach skutkuje spadkiem aktywności enzymu SOD1. Przeprowadzone analizy poziomu ekspresji białka CCS po raz pierwszy pokazały, jak zmienia się on u myszy z wrodzonym defektem w metabolizmie miedzi wywołanym brakiem aktywnego białka ATP7A. U samców mutantów *mosaic* akumulacja miedzi w komórkach kanalików nerkowych wpływa na obniżenie poziomu ekspresji białka CCS, co prawdopodobnie związane jest z procesem degradacji białka CCS. W wyniku degradacji białka CCS w nerkach tych zwierząt obserwuje się również obniżenie poziomu aktywności białka SOD1 wywołanego brakiem odpowiedniego poziomu metalacji formy apo-SOD1. Obniżenie aktywności białka SOD1 w nerkach samców mutantów *mosaic* może w znacznym stopniu przyczynić się do wystąpienia uszkodzeń wywołanych negatywnym działaniem wolnych rodników, powstałych na skutek wysokiego poziomu akumulacji miedzi w obrębie nerek samców mutantów *mosaic*.

10. Literatura

1. Achila D, Banci L, Bertini I, Bunce J, Ciofi-Baffoni S, Huffman DL. Structure of human Wilson protein domains 5 and 6 and their interplay with domain 4 and the copper chaperone HAH1 in copper uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006, 103(15):5729-34
2. Aller SG, Eng ET, De Feo CJ, Unger VM. Eukaryotic CTR copper uptake transporters require two faces of the third transmembrane domain for helix packing, oligomerization, and function. *J Biol Chem*. 2004, 279(51):53435-41
3. Aller SG, Unger VM. Projection structure of the human copper transporter CTR1 at 6-Å resolution reveals a compact trimer with a novel channel-like architecture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006, 103(10):3627-32
4. Antinone SE, Ghadge GD, Ostrow LW, Roos RP, Green WN. S-acylation of SOD1, CCS, and a stable SOD1-CCS heterodimer in human spinal cords from ALS and non-ALS subjects. *Sci Rep*. 2017, 7:41141
5. Aoki T, Copper Deficiency and the Clinical Practice *JMAJ* 47(8): 365–370, 2004, Vol. 129, No. 5, 2003, 617–620
6. Araya, Núñez H, Pavez L, Arredondo M, Méndez M, Cisternas F, Pizarro F, Sierralta W, Uauy R, González M. Administration of high doses of copper to capuchin monkeys does not cause liver damage but induces transcriptional activation of hepatic proliferative responses. *J Nutr*. 2012, 142(2):233-7
7. Arguello JM, Eren E, González-Guerrero M. The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases. *Biometals*. 2007, 20(3-4):233-48
8. Armendariz AD, Gonzalez M, Loguinov AV, Vulpe CD. Gene expression profiling in chronic copper overload reveals upregulation of Prnp and App. *Physiol Genomics*. 2004, 20(1):45-54
9. Armstrong TA, Cook DR, Ward MM, Williams CM, Spears JW. Effect of dietary copper source (cupric citrate and cupric sulfate) and concentration on growth performance and fecal copper excretion in weanling pigs. *J Anim Sci*. 2004, 82(4):1234-40
10. Arnesano F, Banci L, Bertini I, Martinelli M, Furukawa Y, O'Halloran TV. The unusually stable quaternary structure of human Cu,Zn-superoxide dismutase 1 is controlled by both metal occupancy and disulfide status. *J Biol Chem*. 2004, 279(46):47998-8003
11. Arnesano F, Balatri E, Banci L, Bertini I, Winge DR. Folding studies of Cox17 reveal an important interplay of cysteine oxidation and copper binding. *Structure*. 2005, 13(5):713-22

12. Arnold M, Sasse D. Quantitative and histochemical analysis of Cu, Zn, and Fe in spontaneous and induced primary tumors of rats. *Cancer Res.* 1961, 21:761-6
13. Banci L, Bertini I, Cantini F, Chasapis CT, Hadjiliadis N, Rosato A. A NMR study of the interaction of a three-domain construct of ATP7A with copper(I) and copper(I)-HAH1: the interplay of domains. *J Biol Chem.* 2005, 280(46):38259-63
14. Banci L, Bertini I, Ciofi-Baffoni S, Chasapis CT, Hadjiliadis N, Rosato A. An NMR study of the interaction between the human copper(I) chaperone and the second and fifth metal-binding domains of the Menkes protein. *FEBS J.* 2005, 272(3):865-71
15. Banci L, Bertini I, Cefaro C, Ciofi-Baffoni S, Gallo A. Functional role of two interhelical disulfide bonds in human Cox17 protein from a structural perspective. *J Biol Chem.* 2011, 286(39):34382-90
16. Barnes N, Bartee MY, Braiterman L, Gupta A, Ustiyan V, Zuzel V, Kaplan JH, Hubbard AL, Lutsenko S. Cell-specific trafficking suggests a new role for renal ATP7B in the intracellular copper storage. *Traffic.* 2009, 10(6):767-79
17. Barry AN, Shinde U, Lutsenko S. Structural organization of human Cu-transporting ATPases: learning from building blocks. *J Biol Inorg Chem.* 2010, 15(1):47-59
18. Bartnikas TB, Waggoner DJ, Casareno RL, Gaedigk R, White RA, Gitlin JD. Chromosomal localization of CCS, the copper chaperone for Cu/Zn superoxide dismutase. *Mamm Genome.* 2000, 11(5):409-11
19. Bartosz G. Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clin Chim Acta.* 2006, 368(1-2):53-76
20. Bartosz G. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol.* 2009, 77(8):1303-15
21. Bauerly KA, Kelleher SL, Lonnerdal B. Functional and molecular responses of suckling rat pups and human intestinal Caco-2 cells to copper treatment. *J Nutr Biochem.* 2004, 15(3):155-62
22. Bauerly KA, Kelleher SL, Lonnerdal B. Effects of copper supplementation on copper absorption, tissue distribution, and copper transporter expression in an infant rat model. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005, 288(5):G1007-14
23. Beaino W, Guo Y, Chang AJ, Anderson CJ. Roles of Atox1 and p53 in the trafficking of copper-64 to tumor cell nuclei: implications for cancer therapy. *J Biol Inorg Chem.* 2014, 19(3):427-38

24. Beers J, Glerum DM, Tzagoloff A. Purification, characterization, and localization of yeast Cox17p, a mitochondrial copper shuttle. *J Biol Chem.* 1997, 272(52):33191-6
25. Bertinato J, L'Abbé MR. Copper modulates the degradation of copper chaperone for Cu,Zn superoxide dismutase by the 26 S proteasome. *J Biol Chem.* 2003, 278(37):35071-8
26. Bertinato J, Swist E, Plouffe LJ, Brooks SPJ, L'Abbe MR. Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells. *Biochemical Journal* 2008, 409:731–40
27. Bertinato J, Sherrard L, Plouffe LJ. Decreased erythrocyte CCS content is a biomarker of copper overload in rats. *Int J Mol Sci.* 2010, 11(7):2624-35
28. Bhadhrasit W, Kodama H, Fujisawa C, Hiroki T, Ogawa E. Effect of copper and disulfiram combination therapy on the macular mouse, a model of Menkes disease. *J Trace Elem Med Biol.* 2012, 26(2-3):105-8
29. Bordo D, Djinić K, Bolognesi M. Conserved patterns in the Cu,Zn superoxide dismutase family. *J Mol Biol.* 1994, 238(3):366-86
30. Braiterman L, Nyasae L, Guo Y, Bustos R, Lutsenko S, Hubbard A. Apical targeting and Golgi retention signals reside within a 9-amino acid sequence in the copper-ATPase, ATP7B. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009, 296(2):G433-44
31. Brotherton TE, Li Y, Cooper D, Gearing M, Julien JP, Rothstein JD, Boylan K, Glass JD. Localization of a toxic form of superoxide dismutase 1 protein to pathologically affected tissues in familial ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012, 109(14):5505-10
32. Buiakova OI, Xu J, Lutsenko S, Zeitlin S, Das K, Das S, Ross BM, Mekios C, Scheinberg IH, Gilliam TC. Null mutation of the murine ATP7B (Wilson disease) gene results in intracellular copper accumulation and late-onset hepatic nodular transformation. *Hum Mol Genet.* 1999, 8(9):1665-71
33. Cai H, Peng F. Knockdown of copper chaperone antioxidant-1 by RNA interference inhibits copper-stimulated proliferation of non-small cell lung carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2013, 30(1):269-75
34. Camakaris J, Mann JR, Danks DM. Copper metabolism in mottled mouse mutants: copper concentrations in tissues during development. *Biochem J.* 1979, 180(3):597-604
35. Caruano-Yzermans AL, Bartnikas TB, Gitlin JD. Mechanisms of the copper-dependent turnover of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 2006, 281(19):13581-7

36. Casareno RL, Waggoner D, Gitlin JD. The copper chaperone CCS directly interacts with copper/zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1998, 273(37):23625-8
37. Cater MA, La Fontaine S, Shield K, Deal Y, Mercer JF. ATP7B mediates vesicular sequestration of copper: insight into biliary copper excretion. *Gastroenterology*. 2006, 130(2):493-506
38. Cecchi C, Avner P. Genomic organization of the mottled gene, the mouse homologue of the human Menkes disease gene. *Genomics*. 1996, 37(1):96-104
39. Cecchi C, Biasotto M, Tosi M, Avner P. The mottled mouse as a model for human Menkes disease: identification of mutations in the Atp7a gene. *Hum Mol Genet*. 1997, 6(5):829
40. Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD. Molecular immunocytochemistry of the Cu, Zn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol*. 1988, 107(6 Pt 1):2169-79
41. Chelly J, Tumer Z, Tonnesen T, Petterson A, Ishikawa-Brush Y, Tommerup N, Horn N, Monaco AP. Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein. *Nat Genet*. 1993, 3(1):14-9
42. Cheng J, Luo Z, Chen GH, Wei CC, Zhuo MQ. Identification of eight copper (Cu) uptake related genes from yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*, and their tissue expression and transcriptional responses to diet borne Cu exposure. *J Trace Elem Med Biol*. 2017, 44:256-265
43. Choi BS, Zheng W. Copper transport to the brain by the blood-brain barrier and blood-CSF barrier. *Brain Res*. 2009, 1248:14-21
44. Christodoulou J, Danks DM, Sarkar B, Baerlocher KE, Casey R, Horn N, Tumer Z, Clarke JT. Early treatment of Menkes disease with parenteral copper-histidine: long-term follow-up of four treated patients. *Am J Med Genet*. 1998, 76(2):154-64
45. Chun H, Catterton T, Kim H, Lee J, Kim BE. Organ-specific regulation of ATP7A abundance is coordinated with systemic copper homeostasis. *Sci Rep*. 2017, 7(1):12001
46. Clifford RJ, Maryon EB, Kaplan JH. Dynamic internalization and recycling of a metal ion transporter: Cu homeostasis and CTR1, the human Cu⁺ uptake system. *J Cell Sci*. 2016, 129(8):1711-21

47. Cobine PA, Pierrel F, Winge DR. Copper trafficking to the mitochondrion and assembly of copper metalloenzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2006, 1763(7):759-72
48. Collins JF, Prohaska JR, Knutson MD. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr Rev*. 2010, 68(3):133-47
49. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Roife AM. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci*. 2002, 59(4):627-47
50. Crapo JD, Oury T, Rabouille C, Slot JW, Chang LY. Copper, zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992, 89(21):10405-9
51. Cromwell GL, Lindemann MD, Monegue HJ, Hall DD, Orr DE Jr. Tribasic copper chloride and copper sulfate as copper sources for weanling pigs. *J Anim Sci*. 1998, 76(1):118-23
52. Culotta VC, Klomp LW, Strain J, Casareno RL, Krems B, Gitlin JD. The copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1997, 272(38):23469-72
53. Cunliffe P, Reed V, Boyd Y. Intragenic deletions at Atp7a in mouse models for Menkes disease. *Genomics*. 2001, 74(2):155-62
54. Dancis A, Haile D, Yuan DS, Klausner RD. The *Saccharomyces cerevisiae* copper transport protein (Ctr1p). Biochemical characterization, regulation by copper, and physiologic role in copper uptake. *J Biol Chem*. 1994, 269(41):25660-7
55. Daniel KG, Harbach RH, Guida WC, Dou QP. Copper storage diseases: Menkes, Wilsons, and cancer. *Front Biosci*. 2004, 9:2652-62
56. Das S, Levinson B, Vulpe C, Whitney S, Gitschier J, Packman S. Similar splicing mutations of the Menkes/mottled copper-transporting ATPase gene in occipital horn syndrome and the blotchy mouse. *Am J Hum Genet*. 1995, 56(3):570-6
57. Das A, Sudhahar V, Chen GF, Kim HW, Youn SW, Finney L, Vogt S, Yang J, Kweon J, Surenhuu B, Ushio-Fukai M, Fukai T. Endothelial Antioxidant-1: a Key Mediator of Copper-dependent Wound Healing in vivo. *Sci Rep*. 2016, 6:33783
58. Davis SR, Cousins RJ. Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr*. 2000, 130(5):1085-8

59. De Bie P, Muller P, Wijmenga C, Klomp LW. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J Med Genet.* 2007, 44(11):673-88
60. De Feo CJ, Aller SG, Unger VM. A structural perspective on copper uptake in eukaryotes. *Biometals.* 2007, 20(3-4):705-16
61. De Feo CJ, Aller SG, Siluvai GS, Blackburn NJ, Unger VM. Three-dimensional structure of the human copper transporter hCTR1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009, 106(11):4237-42
62. Desai V, Kaler SG. Role of copper in human neurological disorders. *Am J Clin Nutr.* 2008, 88(3):855S-8S
63. Di Donato M, Sarkar B. Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson disease. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1360, 3-16
64. Dirksen K, Roelen YS, van Wolferen ME, Kruitwagen HS, Penning LC, Burgener IA, Spee B, Fieten H. Erythrocyte copper chaperone for superoxide dismutase and superoxide dismutase as biomarkers for hepatic copper concentrations in Labrador retrievers. *Vet J.* 2016, 218:1-6
65. Dijkstra M, Vonk RJ, Kuipers F. How does copper get into bile? New insights into the mechanism(s) of hepatobiliary copper transport. *J Hepatol.* 1996, 24 Suppl 1:109-20
66. Dong D, Xu X, Yin W, Kang YJ. Changes in copper concentrations affect the protein levels but not the mRNA levels of copper chaperones in human umbilical vein endothelial cells. *Metallomics.* 2014, 6(3):554-9
67. Dumay QC, Debut AJ, Mansour NM, Saier MH Jr. The copper transporter (Ctr) family of Cu⁺ uptake systems. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2006, 11(1-2):10-9
68. Eisses JF, Kaplan JH. The mechanism of copper uptake mediated by human CTR1: a mutational analysis. *J Biol Chem.* 2005, 280(44):37159-68
69. El Meskini R, Culotta VC, Mains RE, Eipper BA. Supplying copper to the cuproenzyme peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase. *J Biol Chem.* 2003, 278(14):12278-84
70. Engidawork E, Lubec G. Protein expression in Down syndrome brain. *Amino Acids.* 2001, 21(4):331-61

71. Favier RP, Spee B, Fieten H, van den Ingh TS, Schotanus BA, Brinkhof B, Rothuizen J, Penning LC. Aberrant expression of copper associated genes after copper accumulation in COMMD1-deficient dogs. *J Trace Elem Med Biol*. 2015, 29:347-53
72. Fuchs AG, de Lustig ES. Localization of tissue copper in mouse mammary tumors. *Oncology*. 1989, 46(3):183-7
73. Fujii T, Ito M, Tsuda H, Mikawa H. Biochemical study on the critical period for treatment of the mottled brindled mouse. *J Neurochem*. 1990, 55(3):885-9
74. Furukawa Y, O'Halloran TV. Posttranslational modifications in Cu,Zn-superoxide dismutase and mutations associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxid Redox Signal*. 2006, 8(5-6):847-67
75. Glerum DM, Shtanko A, Tzagoloff A. Characterization of COX17, a yeast gene involved in copper metabolism and assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem*. 1996, 271(24):14504-9
76. Godwin SC, Shawker T, Chang B, Kaler SG. Brachial artery aneurysms in Menkes disease. *J Pediatr*. 2006 Sep;149(3):412-5
77. Gray LW, Peng F, Molloy SA, Pendyala VS, Muchenditsi A, Muzik O, Lee J, Kaplan JH, Lutsenko S. Urinary copper elevation in a mouse model of Wilson's disease is a regulated process to specifically decrease the hepatic copper load. *PLoS One*. 2012, 7(6):e38327
78. Grimes A, Hearn CJ, Lockhart P, Newgreen DF, Mercer JF. Molecular basis of the brindled mouse mutant (Mo(br)): a murine model of Menkes disease. *Hum Mol Genet*. 1997, 6(7):1037-42
79. Grzelak A, Kruszewski M, Macierzyńska E, Piotrowski Ł, Pułaski Ł, Rychlik B, Bartosz G. The effects of superoxide dismutase knockout on the oxidative stress parameters and survival of mouse erythrocytes. *Cell Mol Biol Lett*. 2009 14(1):23-34
80. Gu YH, Kodama H, Shiga K, Nakata S, Yanagawa Y, Ozawa H. A survey of Japanese patients with Menkes disease from 1990 to 2003: incidence and early signs before typical symptomatic onset, pointing the way to earlier diagnosis. *J Inherit Metab Dis*. 2005, 28(4):473-8
81. Gu YH, Kodama H, Ogawa E, Sato Y, Motoyama K, Yagi M, Yoshida S, Ohkubo T. Changes in body weight and height in survivors of Menkes disease. *J Trace Elem Med Biol*. 2014, 28(4):470-3

82. Gulec S, Collins JF. Investigation of iron metabolism in mice expressing a mutant Menke's copper transporting ATPase (Atp7a) protein with diminished activity (Brindled; Mo (Br) (/y)). PLoS One. 2013, 8(6):e66010
83. Guo Y, Smith K, Lee J, Thiele DJ, Petris MJ. Identification of methionine-rich clusters that regulate copper-stimulated endocytosis of the human Ctr1 copper transporter. J Biol Chem. 2004, 279(17):17428-33
84. Gupta A, Lutsenko S. Human copper transporters: mechanism, role in human diseases and therapeutic potential. Future Med Chem. 2009, 1(6):1125-42
85. Haddad MR, Patel KD, Sullivan PH, Goldstein DS, Murphy KM, Centeno JA, Kaler SG. Molecular and biochemical characterization of Mottled-dappled, an embryonic lethal Menkes disease mouse model. Mol Genet Metab. 2014, 113(4):294-300
86. Haddad MR, Choi EY, Zerfas PM, Yi L, Martinelli D, Sullivan P, Goldstein DS, Centeno JA, Brinster LR, Ralle M, Kaler SG. Cerebrospinal Fluid-Directed rAAV9-rsATP7A Plus Subcutaneous Copper Histidinate Advance Survival and Outcomes in a Menkes Disease Mouse Model. Mol Ther Methods Clin Dev. 2018, 10:165-178
87. Hamer DH. 'Kinky hair' disease sheds light on copper metabolism. Nat Genet. 1993, 3(1):3-4
88. Hamza I, Klomp LW, Gaedigk R, White RA, Gitlin JD. Structure, expression, and chromosomal localization of the mouse Atox1 gene. Genomics. 2000, 63(2):294-7.
89. Hamza I, Faisst A, Prohaska J, Chen J, Gruss P, Gitlin JD. The metallochaperone Atox1 plays a critical role in perinatal copper homeostasis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001, 98(12):6848-52
90. Hamza I, Prohaska J, Gitlin JD. Essential role for Atox1 in the copper-mediated intracellular trafficking of the Menkes ATPase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003, 100(3):1215-20
91. Hardman B, Manuelpillai U, Wallace EM, Monty JF, Kramer DR, Kuo YM, Mercer JF, Ackl and ML. Expression, localisation and hormone regulation of the human copper transporter hCTR1 in placenta and choriocarcinoma Jeg-3 cells. Placenta. 2006, 27(9-10):968-77
92. Hardman B, Michalczyk A, Greenough M, Camakaris J, Mercer J, Ackland L. Distinct functional roles for the Menkes and Wilson copper translocating P-type ATPases in human placental cells. Cell Physiol Biochem. 2007, 20(6):1073-84

93. Harris ED. Cellular copper transport and metabolism. *Annu Rev Nutr.* 2000, 20:291-310
94. Hatori Y, Lutsenko S. An expanding range of functions for the copper chaperone/antioxidant protein Atox1. *Antioxid Redox Signal.* 2013, 19(9):945-57
95. Haywood S, Trafford J, Loughran M. Copper toxicosis and tolerance in the rat: IV. Renal tubular excretion of copper. *Br J Exp Pathol.* 1985, 66(6):699-707
96. Heaton D, Nittis T, Srinivasan C, Winge DR. Mutational analysis of the mitochondrial copper metallochaperone Cox17. *J Biol Chem.* 2000, 275(48):37582-7
97. Hellman NE, Kono S, Mancini GM, Hoogeboom AJ, De Jong GJ, Gitlin JD. Mechanisms of copper incorporation into human ceruloplasmin. *J Biol Chem.* 2002, 277(48):46632-8
98. Horn N., Tumer Z. Molecular genetics of intracellular copper transport. *J Trace Elem Exper Med.* 1999, 12, 297-313
99. Horn N, Moller LB, Nurchi VM, Aaseth J. Chelating principles in Menkes and Wilson diseases: Choosing the right compounds in the right combinations at the right time. *J Inorg Biochem.* 2019, 190:98-112
100. Hsi G, Cox DW. A comparison of the mutation spectra of Menkes disease and Wilson disease. *Hum Genet.* 2004, 114(2):165-72
101. Huang YL, Ashwell MS, Fry RS, Lloyd KE, Flowers WL, Spears JW. Effect of dietary copper amount and source on copper metabolism and oxidative stress of weanling pigs in short-term feeding. *J Anim Sci.* 2015, 93(6):2948-55
102. Hung IH, Casareno RL, Labesse G, Mathews FS, Gitlin JD. HAH1 is a copper-binding protein with distinct amino acid residues mediating copper homeostasis and antioxidant defense. *J Biol Chem.* 1998, 273(3):1749-54
103. Hunt DM. A study of copper treatment and tissue copper levels in the murine congenital copper deficiency, mottled. *Life Sci.* 1976, 19(12):1913-9
104. Huster D. Wilson disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010, 24(5):531-9
105. Huster D, Finegold MJ, Morgan CT, Burkhead JL, Nixon R, Vanderwerf SM, Gilliam CT, Lutsenko S. Consequences of copper accumulation in the livers of the Atp7b^{-/-} (Wilson disease gene) knockout mice. *Am J Pathol.* 2006, 168(2):423-34

106. Huster D, Lutsenko S. Wilson disease: not just a copper disorder. Analysis of a Wilson disease model demonstrates the link between copper and lipid metabolism. *Mol Biosyst.* 2007, 3(12):816-24
107. Huster D, Purnat TD, Burkhead JL, Ralle M, Fiehn O, Stuckert F, Olson NE, Teupser D, Lutsenko S. High copper selectively alters lipid metabolism and cell cycle machinery in the mouse model of Wilson disease. *J Biol Chem.* 2007, 282(11):8343-55
108. Itoh S, Kim HW, Nakagawa O, Ozumi K, Lessner SM, Aoki H, Akram K, McKinney RD, Ushio-Fukai M, Fukai T. Novel role of antioxidant-1 (Atox1) as a copper-dependent transcription factor involved in cell proliferation. *J Biol Chem.* 2008, 283(14):9157-67
109. Itoh S, Ozumi K, Kim HW, Nakagawa O, McKinney RD, Folz RJ, Zelko IN, Ushio-Fukai M, Fukai T. Novel mechanism for regulation of extracellular SOD transcription and activity by copper: role of antioxidant-1. *Free Radic Biol Med.* 2009, 46(1):95-104
110. Jeney V, Itoh S, Wendt M, Gradek Q, Ushio-Fukai M, Harrison DG, Fukai T. Role of antioxidant-1 in extracellular superoxide dismutase function and expression. *Circ Res.* 2005, 96(7):723-9
111. Jensen PY, Bonander N, Moller LB, Farver O. Cooperative binding of copper(I) to the metal binding domains in Menkes disease protein. *Biochim Biophys Acta.* 1999, 1434(1):103-13
112. Kaler SG. ATP7A-related copper transport diseases-emerging concepts and future trends. *Nat Rev Neurol.* 2011, 7(1):15-29
113. Kaler SG. Inborn errors of copper metabolism. *Handb Clin Neurol.* 2013, 113:1745-54
114. Kaler SG. Neurodevelopment and brain growth in classic Menkes disease is influenced by age and symptomatology at initiation of copper treatment. *J Trace Elem Med Biol.* 2014, 28(4):427-30
115. Kaler SG, Holmes CS, Goldstein DS, Tang J, Godwin SC, Donsante A, Liew CJ, Sato S, Patronas N. Neonatal diagnosis and treatment of Menkes disease. *N Engl J Med.* 2008, 358(6):605-14
116. Kaler SG, Liew CJ, Donsante A, Hicks JD, Sato S, Greenfield JC. Molecular correlates of epilepsy in early diagnosed and treated Menkes disease. *J Inherit Metab Dis.* 2010, 33(5):583-9

117. Kako K, Tsumori K, Ohmasa Y, Takahashi Y, Munekata E. The expression of Cox17p in rodent tissues and cells. *Eur J Biochem.* 2000, 267(22):6699-707
118. Kaplan JH, Lutsenko S. Copper transport in mammalian cells: special care for a metal with special needs. *J Biol Chem.* 2009, 284(38):25461-5
119. Kelly EJ, Palmiter RD. A murine model of Menkes disease reveals a physiological function of metallothionein. *Nat Genet.* 1996, 13(2):219-22
120. Khare SD, Caplow M, Dokholyan NV. The rate and equilibrium constants for a multistep reaction sequence for the aggregation of superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101(42):15094-9
121. Kim BE, Petris MJ. Phenotypic diversity of Menkes disease in mottled mice is associated with defects in localisation and trafficking of the ATP7A protein. *J Med Genet.* 2007, 44(10):641-6
122. Kim H, Son HY, Bailey SM, Lee J. Deletion of hepatic Ctr1 reveals its function in copper acquisition and compensatory mechanisms for copper homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009, 296(2):G356-64
123. Kim JH, Lee BH, Kim YM, Choi JH, Kim GH, Cheon CK, Yoo HW. Novel mutations and clinical outcomes of copper-histidine therapy in Menkes disease patients. *Metab Brain Dis.* 2015, 30(1):75-81
124. Kim MY, Kim JH, Cho MH, Choi YH, Kim SH, Im YJ, Park K, Kang HG, Chae JH, Cheong HI. Urological Problems in Patients with Menkes Disease. *J Korean Med Sci.* 2018, 34(1):e4
125. Kirby BJ, Danks DM, Legge GJ, Mercer JF. Analysis of the distribution of Cu, Fe and Zn and other elements in brindled mouse kidney using a scanning proton microprobe. *J Inorg Biochem.* 1998, 71(3-4):189-97
126. Klinman JP. The copper-enzyme family of dopamine beta-monooxygenase and peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase: resolving the chemical pathway for substrate hydroxylation. *J Biol Chem.* 2006, 281(6):3013-6
127. Klomp LW, Lin SJ, Yuan DS, Klausner RD, Culotta VC, Gitlin JD. Identification and functional expression of HAH1, a novel human gene involved in copper homeostasis. *J Biol Chem.* 1997, 272(14):9221-6.

128. Klomp AE, Tops BB, Van Denberg IE, Berger R, Klomp LW. Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1). *Biochem J*. 2002, 364(Pt 2):497-505
129. Knight SA, Labbe S, Kwon LF, Kosman DJ, Thiele DJ. A widespread transposable element masks expression of a yeast copper transport gene. *Genes Dev*. 1996, 10(15):1917-29
130. Knopfel M, Solioz M. Characterization of a cytochrome b(558) ferric/cupric reductase from rabbit duodenal brush border membranes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002, 291(2):220-5
131. Kodama H. Recent developments in Menkes disease. *J Inherit Metab Dis*. 1993, 16(4):791-9
132. Kodama H, Abe T, Takama M, Takahashi I, Kodama M, Nishimura M. Histochemical localization of copper in the intestine and kidney of macular mice: light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem*. 1993, 41(10):1529-35
133. Kodama H, Sato E, Gu YH, Shiga K, Fujisawa C, Kozuma T. Effect of copper and diethyldithiocarbamate combination therapy on the macular mouse, an animal model of Menkes disease. *J Inherit Metab Dis*. 2005, 28(6):971-8
134. Kodama H, Fujisawa C, Bhadhprasit W. Pathology, clinical features and treatments of congenital copper metabolic disorders-focus on neurologic aspects. *Brain Dev*. 2011, 33(3):243-51
135. Kodama H, Fujisawa C, Bhadhprasit W. Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment. *Curr Drug Metab*. 2012, 13(3):237-50
136. Koopman WJ, Nijtmans LG, Dieteren CE, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JA, Willems PH. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid Redox Signal*. 2010, 12(12):1431-70
137. Kowal M, Lenartowicz M, Pecio A, Gołas A, Błaszkiwicz T, Styrna J. Copper metabolism disorders affect testes structure and gamete quality in male mice. *Syst Biol Reprod Med*. 2010, 56(6):431-44
138. Krzanowska H. New mutation. *Mouse News Letter* 1966, 35, 34-35
139. Kuo YM, Gitschier J, Packman S. Developmental expression of the mouse mottled and toxic milk genes suggests distinct functions for the Menkes and Wilson disease copper transporters. *Hum Mol Genet*. 1997, 6(7):1043-9

140. Kuo YM, Gitschier J, Packman S. Developmental expression of the mouse mottled and toxic milk genes. *Adv Exp Med Biol*. 1999, 448:109-14
141. Kuo YM, Zhou B, Cosco D, Gitschier J. The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(12):6836-41
142. Kuo YM, Gybina AA, Pyatskowitz JW, Gitschier J, Prohaska JR. Copper transport protein (Ctr1) levels in mice are tissue specific and dependent on copper status. *J Nutr*. 2006, 136(1):21-6
143. La Fontaine S, Firth SD, Lockhart PJ, Brooks H, Camakaris J, Mercer JF. Intracellular localization and loss of copper responsiveness of Mnk, the murine homologue of the Menkes protein, in cells from blotchy (Mo blo) and brindled (Mo br) mouse mutants. *Hum Mol Genet*. 1999, 8(6):1069-75
144. La Fontaine S, Mercer JF. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis. *Arch Biochem Biophys*. 2007, 463(2):149-67
145. Lamb AL, Wernimont AK, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV, Rosenzweig AC. Crystal structure of the copper chaperone for superoxide dismutase. *Nat Struct Biol*. 1999, 6(8):724-9
146. Lamb AL, Torres AS, O'Halloran TV, Rosenzweig AC. Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone. *Nat Struct Biol*. 2001, 8(9):751-5
147. Larson CA, Adams PL, Jandial DD, Blair BG, Safaei R, Howell SB. The role of the N-terminus of mammalian copper transporter 1 in the cellular accumulation of cisplatin. *Biochem Pharmacol*. 2010, 80(4):448-54
148. Lassi KC, Prohaska JR. Erythrocyte copper chaperone for superoxide dismutase is increased following marginal copper deficiency in adult and postweanling mice. *J Nutr*. 2012, 142(2):292-7
149. Lech T, Sadlik JK. Copper concentration in body tissues and fluids in normal subjects of southern Poland. *Biol Trace Elem Res*. 2007, 118(1):10-5
150. Lee J, Prohaska JR, Dagenais SL, Glover TW, Thiele DJ. Isolation of a murine copper transporter gene, tissue specific expression and functional complementation of a yeast copper transport mutant. *Gene*. 2000, 254(1-2):87-96

151. Lee J, Prohaska JR, Thiele DJ. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001, 98(12):6842-7
152. Lee J, Petris MJ, Thiele DJ. Characterization of mouse embryonic cells deficient in the ctr1 high affinity copper transporter. Identification of a Ctr1-independent copper transport system. *J Biol Chem*. 2002, 277(43):40253-9
153. Leitch JM, Jensen LT, Bouldin SD, Outten CE, Hart PJ, Culotta VC. Activation of Cu,Zn-superoxide dismutase in the absence of oxygen and the copper chaperone CCS. *J Biol Chem*. 2009, 284(33):21863-71
154. Leitch JM, Yick PJ, Culotta VC. The right to choose: multiple pathways for activating copper, zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 2009, 284(37):24679-83
155. Lenartowicz M, Sasuła K. Altered copper metabolism in the mosaic mutant mice. *Nutr Res* 2000 20, 10, 1467-1471
156. Lenartowicz M, Sasuła K, Zawadowska B. Alterations in kidney morphology in mice with mosaic mutation. *Folia Histochem Cytobiol*. 2001, 39(3):275-81
157. Lenartowicz M, Kowal M, Buda-Lewandowska D, Styrna J. Pathological structure of the kidney from adult mice with mosaic mutation. *J Inherit Metab Dis*. 2002, 25(8):647-59
158. Lenartowicz M, Grzmil P, Rusin M, Styrna J. Alternative splicing in the Atp7a gene in the Cu deficient mosaic mutation in mice. *Folia Biol (Krakow)*. 2004, 52(3-4):219-23
159. Lenartowicz M, Wieczerzak K, Krzeptowski W, Dobosz P, Grzmil P, Starzyński R, Lipiński P. Developmental changes in the expression of the Atp7a gene in the liver of mice during the postnatal period. *J Exp Zool A Ecol Genet Physiol*. 2010, 313(4):209-17
160. Lenartowicz M, Windak R, Tylko G, Kowal M, Styrna J. Effects of copper supplementation on the structure and content of elements in kidneys of mosaic mutant mice. *Biol Trace Elem Res*. 2010, 136(2):204-20
161. Lenartowicz M. Badania nad ekspresją i funkcją genu i białka ATP7A (ATPazy transportującej kationy miedziowe) u myszy. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków, 2011
162. Lenartowicz M, Starzyński R, Wieczerzak K, Krzeptowski W, Lipiński P, Styrna J. Alterations in the expression of the Atp7a gene in the early postnatal development of the mosaic mutant mice (Atp7a mo-ms) - An animal model for Menkes disease. *Gene Expr Patterns*. 2011, 11(1-2):41-7

163. Lenartowicz M, Grzmil P, Shoukier M, Starzyński R, Marciniak M, Lipiński P. Mutation in the CPC motif-containing 6th transmembrane domain affects intracellular localization, trafficking and copper transport efficiency of ATP7A protein in mosaic mutant mice-an animal model of Menkes disease. *Metallomics*. 2012, 4(2):197-204
164. Lenartowicz M, Krzeptowski W, Koteja P, Chrzęścik K, Moller LB. Prenatal treatment of mosaic mice (Atp7a mo-ms) mouse model for Menkes disease, with copper combined by dimethyldithiocarbamate (DMDTC). *PLoS One*. 2012, 7(7):e40400
165. Lenartowicz M, Starzyński RR, Krzeptowski W, Grzmil P, Bednarz A, Ogórek M, Pierzchała O, Staroń R, Gajowiak A, Lipiński P. Haemolysis and perturbations in the systemic iron metabolism of suckling, copper-deficient mosaic mutant mice - an animal model of Menkes disease. *PLoS One*. 2014, 9(9):e107641
166. Lenartowicz M, Kennedy C, Hayes H, McArdle HJ. Transcriptional regulation of copper metabolism genes in the liver of fetal and neonatal control and iron-deficient rats. *Biomaterials*. 2015, 28(1):51-9
167. Lenartowicz M, Krzeptowski W, Lipiński P, Grzmil P, Starzyński R, Pierzchała O, Moller LB. Mottled Mice and Non-Mammalian Models of Menkes Disease. *Front Mol Neurosci*. 2015, 8:72
168. Lenartowicz M, Starzyński RR, Jończy A, Staroń R, Antoniuk J, Krzeptowski W, Grzmil P, Bednarz A, Pierzchała O, Ogórek M, Rajfur Z, Baster Z, Lipiński P. Copper therapy reduces intravascular hemolysis and derepresses ferroportin in mice with mosaic mutation (Atp7a^{mo-ms}): An implication for copper-mediated regulation of the Slc40a1 gene expression. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017, 1863(6):1410-1421
169. Leone A, Pavlakis GN, Hamer DH. Menkes disease: abnormal metallothionein gene regulation in response to copper. *Cell*. 1985, 40(2):301-9
170. Levinson B, Vulpe C, Elder B, Martin C, Verley F, Packman S, Gitschier J. The mottled gene is the mouse homologue of the Menkes disease gene. *Nat Genet*. 1994, 6(4):369-73
171. Liang ZD, Tsai WB, Lee MY, Savaraj N, Kuo MT. Specificity protein 1 (sp1) oscillation is involved in copper homeostasis maintenance by regulating human high-affinity copper transporter 1 expression. *Mol Pharmacol*. 2012, 81(3):455-64
172. Lin SJ, Pufahl RA, Dancis A, O'Halloran TV, Culotta VC. A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J Biol Chem*. 1997, 272(14):9215-20

173. Linder MC, Wooten L, Cerveza P, Cotton S, Shulze R, Lomeli N. Copper transport. *Am J Clin Nutr.* 1998, 67(5 Suppl):965S-971S
174. Linz R, Lutsenko S. Copper-transporting ATPases ATP7A and ATP7B: cousins, not twins. *J Bioenerg Biomembr.* 2007, 39(5-6):403-7
175. Linz R, Barnes NL, Zimnicka AM, Kaplan JH, Eipper B, Lutsenko S. Intracellular targeting of copper-transporting ATPase ATP7A in a normal and *Atp7b*^{-/-} kidney. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008, 294(1):F53-61
176. Liu PC, Koeller DM, Kaler SG. Genomic organization of ATOX1, a human copper chaperone. *BMC Genet.* 2003, 4:4
177. Liu L, Qi J, Yang Z, Peng L, Li C. Low-affinity copper transporter CTR2 is regulated by copper-sensing transcription factor Mac1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, 420(3):600-4
178. Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dmitriev OY. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev.* 2007, 87(3):1011-46
179. Lutsenko S. *Atp7b*^{-/-} mice as a model for studies of Wilson's disease. *Biochem Soc Trans.* 2008, 36(Pt 6):1233-8
180. Lutsenko S., Gupta A., Burkhead J. L., Zuzel V. Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance. *Arch Biochem Biophys.* 2008, 476, 22-32
181. Machado A, Chien HF, Deguti MM, Cançado E, Azevedo RS, Scaff M, Barbosa ER. Neurological manifestations in Wilson's disease: Report of 119 cases. *Mov Disord.* 2006, 21(12):2192-6
182. Mann JR, Camakaris J, Danks DM, Walliczek EG. Copper metabolism in mottled mouse mutants: copper therapy of brindled (*Mobr*) mice. *Biochem J.* 1979, 180(3):605-12
183. Maryon EB, Molloy SA, Kaplan JH. O-linked glycosylation at threonine 27 protects the copper transporter hCTR1 from proteolytic cleavage in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 2007, 282:20376–87
184. Matson Dzebo M, Blockhuys S, Valenzuela S, Celauro E, Esbjörner EK, Wittung-Stafshede P. Copper Chaperone Atox1 Interacts with Cell Cycle Proteins. *Comput Struct Biotechnol J.* 2018, 16:443-449

185. Maxfield AB, Heaton DN, Winge DR. Cox17 is functional when tethered to the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem*. 2004, 279(7):5072-80
186. Menkes JH, Alter M, Steigleder GK, Weakley DR, Sung JH. A sex-linked recessive disorder with retardation of growth, peculiar hair, and focal cerebral and cerebellar degeneration. *Pediatrics*. 1962, 29:764-79
187. Mercer JF, Grimes A, Rauch H. Hepatic metallothionein gene expression in toxic milk mice. *J Nutr*. 1992, 122(6):1254-9
188. Mercer JF, Livingston J, Hall B, Paynter JA, Begy C, Chandrasekharappa S, Lockhart P, Grimes A, Bhawe M, Siemieniak D. Isolation of a partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nat Genet*. 1993, 3(1):20-5
189. Mercer JF, Grimes A, Ambrosini L, Lockhart P, Paynter JA, Dierick H, Glover TW. Mutations in the murine homologue of the Menkes gene in dappled and blotchy mice. *Nat Genet*. 1994, 6(4):374-8
190. Mercer JF, Barnes N, Stevenson J, Strausak D, Llanos RM. Copper-induced trafficking of the Cu-ATPases: a key mechanism for copper homeostasis. *Biometals*. 2003, 16(1):175-84
191. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem*. 1969, 244(22):6049-55
192. Michalczyk A, Bastow E, Greenough M, Camakaris J, Freestone D, Taylor P, Linder M, Mercer J, Ackland ML. ATP7B expression in human breast epithelial cells is mediated by lactational hormones. *J Histochem Cytochem*. 2008, 56(4):389-99
193. Migdał A, Juszczak Z. Pigmentacja cebulek włosowych i włosów u myszy z mutacją Ms (Mosaic). 1975, *Zw Labor*, 12, 27-34
194. Miyayama T, Suzuki KT, Ogra Y. Copper accumulation and compartmentalization in mouse fibroblast lacking metallothionein and copper chaperone, Atox1. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009, 237(2):205-13
195. Mohan P, Failla M, Bremner I, Arthur-Smith A, Kerzner B. Biliary copper excretion in the neonatal rat: role of glutathione and metallothionein. *Hepatology*. 1995, 21(4):1051-7
196. Moller LB, Mogensen M, Horn N. Molecular diagnosis of Menkes disease: genotype-phenotype correlation. *Biochimie*. 2009, 91(10):1273-7
197. Molloy SA, Kaplan JH. Copper-dependent recycling of hCTR1, the human high affinity copper transporter. *J Biol Chem*. 2009, 284(43):29704-13

198. Montes S, Rivera-Mancia S, Diaz-Ruiz A, Tristan-Lopez L, Rios C. Copper and copper proteins in Parkinson's disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2014, 2014:147251
199. Moore SD, Cox DW. Expression in mouse kidney of membrane copper transporters Atp7a and Atp7b. *Nephron*. 2002, 92(3):629-34
200. Mototani Y, Miyoshi I, Okamura T, Moriya T, Meng Y, Yuan Pei X, Kameo S, Kasai N. Phenotypic and genetic characterization of the Atp7a(Mo-Tohm) mottled mouse: a new murine model of Menkes disease. *Genomics*. 2006, 87(2):191-9
201. Muller PA, Klomp LW. ATOX1: a novel copper-responsive transcription factor in mammals? *Int J Biochem Cell Biol*. 2009, 41(6):1233-6
202. Murata Y, Kodama H, Abe T, Ishida N, Nishimura M, Levinson B, Gitschier J, Packman S. Mutation analysis and expression of the mottled gene in the macular mouse model of Menkes disease. *Pediatr Res*. 1997, 42(4):436-42
203. Murray R, Granner D, Mayes P, Rodwell V. *Biochemia Harpera*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1995 (wydanie III)
204. Nagamine T, Nakajima K. Significance of metallothionein expression in liver disease. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013, 14(4):420-6
205. Nakagawa S, Adachi R, Mijake M, Hama T, Tanaka K, Mayumi T. Production of Normal - Macular Mouse Chimeras: The Presence of Critical Tissue in the Macular Mutant Mouse, a Model of Menkes' kinky Hair Disease, 1993, *Zoological Science* 10, 653-660
206. Narayanan G, R BS, Vuyyuru H, Muthuvel B, Konerirajapuram Natrajan S. CTR1 silencing inhibits angiogenesis by limiting copper entry into endothelial cells. *PLoS One*. 2013, 8(9):e71982
207. Niciu MJ, Ma XM, El Meskini R, Ronnett GV, Mains RE, Eipper BA. Developmental changes in the expression of ATP7A during a critical period in postnatal neurodevelopment. *Neuroscience*. 2006, 139(3):947-64
208. Nielsen S, Kwon TH, Frokiaer J, Agre P. Regulation and dysregulation of aquaporins in water balance disorders. *J Intern Med*. 2007, 261(1):53-64
209. Nose Y, Kim BE, Thiele DJ. Ctr1 drives intestinal copper absorption and is essential for growth, iron metabolism, and neonatal cardiac function. *Cell Metab*. 2006, 4(3):235-44

210. Nose Y, Wood LK, Kim BE, Prohaska JR, Fry RS, Spears JW, Thiele DJ. Ctr1 is an apical copper transporter in mammalian intestinal epithelial cells in vivo that is controlled at the level of protein stability. *J Biol Chem.* 2010, 285(42):32385-92
211. O'Halloran TV, Culotta VC. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem.* 2000, 275(33):25057-60
212. Ohgami RS, Campagna DR, McDonald A, Fleming MD. The Steap proteins are metalloreductases. *Blood.* 2006, 108(4):1388-94
213. Ohrvik H, Nose Y, Wood LK, Kim BE, Gleber SC, Ralle M, Thiele DJ. Ctr2 regulates biogenesis of a cleaved form of mammalian Ctr1 metal transporter lacking the copper- and cisplatin-binding ecto-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, 110(46):E4279-88
214. Ohrvik H, Thiele DJ. The role of Ctr1 and Ctr2 in mammalian copper homeostasis and platinum-based chemotherapy. *J Trace Elem Med Biol.* 2015, 31:178-82
215. Ohrvik H, Wittung-Stafshede P. Identification of New Potential Interaction Partners for Human Cytoplasmic Copper Chaperone Atox1: Roles in Gene Regulation? *Int J Mol Sci.* 2015, 16(8):16728-39
216. Ogórek M, Lenartowicz M, Starzyński R, Jończy A, Staroń R, Doniec A, Krzeptowski W, Bednarz A, Pierzchała O, Lipiński P, Rajfur Z, Baster Z, Gibas-Tybur P, Grzmil P. Atp7a and Atp7b regulate copper homeostasis in developing male germ cells in mice. *Metallomics.* 2017, 9(9):1288-1303
217. Olivares M, Lonnerdal B, Abrams SA, Pizarro F, Uauy R. Age and copper intake do not affect copper absorption, measured with the use of ⁶⁵Cu as a tracer, in young infants. *Am J Clin Nutr.* 2002, 76(3):641-5
218. Ooi CE, Rabinovich E, Dancis A, Bonifacino JS, Klausner RD. Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J.* 1996, 15(14):3515-23
219. Oshio T, Hino M, Kirino A, Matsumura C, Fukuda K. Urologic abnormalities in Menkes' kinky hair disease: report of three cases. *J Pediatr Surg.* 1997, 32(5):782-4
220. Palumaa P. Copper chaperones. The concept of conformational control in the metabolism of copper. *FEBS Lett.* 2013, 587(13):1902-10

221. Petris MJ, Camakaris J, Greenough M, LaFontaine S, Mercer JF. A C-terminal dileucine is required for localization of the Menkes protein in the trans-Golgi network. *Hum Mol Genet.* 1998, 7(13):2063-71
222. Petris MJ, Strausak D, Mercer JF. The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. *Hum Mol Genet.* 2000, 9(19):2845-51
223. Petris MJ, Smith K, Lee J, Thiele DJ. Copper-stimulated endocytosis and degradation of the human copper transporter, hCtr1. *J Biol Chem.* 2003, 278(11):9639-46
224. Petris MJ. The SLC31 (Ctr) copper transporter family. *Pflugers Arch.* 2004, 447(5):752-5
225. Phillips M, Camakaris J, Danks DM. Comparisons of copper deficiency states in the murine mutants blotchy and brindled. Changes in copper-dependent enzyme activity in 13-day-old mice. *Biochem J.* 1986, 238(1):177-83
226. Phillips M, Camakaris J, Danks DM. A comparison of phenotype and copper distribution in blotchy and brindled mutant mice and in nutritionally copper deficient controls. *Biol Trace Elem Res.* 1991, 29(1):11-29
227. Pierzchała O, Ogórek M, Bednarz A, Lenartowicz M. Budowa i funkcja białek z rodziny CTR – błonowych transporterów jednowartościowych jonów metali. *Post Biol Kom.* 2015, 42(2) 351-374
228. Prohaska JR. Changes in tissue growth, concentrations of copper, iron, cytochrome oxidase and superoxide dismutase subsequent to dietary or genetic copper deficiency in mice. *J Nutr.* 1983, 113(10):2048-58
229. Prohaska JR. Repletion of copper-deficient mice and brindled mice with copper or iron. *J Nutr.* 1984, 114(2):422-30
230. Prohaska JR. Neurological roles of copper as antioxidant or prooxidant [w:] Connor JR (red.) *Metals and oxidative damage in neurological disorders.* Plenum Press, New York, 57-74
231. Prohaska JR, Broderius M, Brokate B. Metallochaperone for Cu,Zn-superoxide dismutase (CCS) protein but not mRNA is higher in organs from copper-deficient mice and rats. *Arch Biochem Biophys.* 2003, 417(2):227-34
232. Prohaska JR, Geissler J, Brokate B, Broderius M. Copper, zinc-superoxide dismutase protein but not mRNA is lower in copper-deficient mice and mice lacking the copper chaperone for superoxide dismutase. *Exp Biol Med.* 2003, 228(8):959-66

233. Prohaska JR, Gybina AA. Intracellular copper transport in mammals. *J Nutr.* 2004, 134(5):1003-6
234. Proud VK, Mussell HG, Kaler SG, Young DW, Percy AK. Distinctive Menkes disease variant with occipital horns: delineation of natural history and clinical phenotype. *Am J Med Genet.* 1996, 65(1):44-51
235. Puig S, Lee J, Lau M, Thiele DJ. Biochemical and genetic analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J Biol Chem.* 2002, 277(29):26021-30
236. Punter FA, Adams DL, Glerum DM. Characterization and localization of human COX17, a gene involved in mitochondrial copper transport. *Hum Genet.* 2000, 107(1):69-74
237. Pyatskowitz JW, Prohaska JR. Copper deficient rats and mice both develop anemia but only rats have lower plasma and brain iron levels. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2008, 147(3):316-23
238. Qin Z, Itoh S, Jeney V, Ushio-Fukai M, Fukai T. Essential role for the Menkes ATPase in activation of extracellular superoxide dismutase: implication for vascular oxidative stress. *FASEB J.* 2006, 20(2):334-6
239. Radochońska A. Effects of gene Mosaic (ms) on growth rate, weight of organs and hair structure in mouse. *Genet Polon* 1970, 11, 257-275
240. Rae TD, Schmidt PJ, Pufahl RA, Culotta VC, O'Halloran TV. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.* 1999, 284(5415):805-8
241. Rae TD, Torres AS, Pufahl RA, O'Halloran TV. Mechanism of Cu,Zn-superoxide dismutase activation by the human metallochaperone hCCS. *J Biol Chem.* 2001, 276(7):5166-76
242. Ralle M, Huster D, Vogt S, Schirrmeister W, Burkhead JL, Capps TR, Gray L, Lai B, Maryon E, Lutsenko S. Wilson disease at a single cell level: intracellular copper trafficking activates compartment-specific responses in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2010, 285(40):30875-83
243. Ranganathan PN, Lu Y, Jiang L, Kim C, Collins JF. Serum ceruloplasmin protein expression and activity increases in iron-deficient rats and is further enhanced by higher dietary copper intake. *Blood.* 2011, 118(11):3146-53

244. Ravia JJ, Stephen RM, Ghishan FK, Collins JF. Menkes Copper ATPase (Atp7a) is a novel metal-responsive gene in rat duodenum, and immunoreactive protein is present on brush-border and basolateral membrane domains. *J Biol Chem*. 2005, 280(43):36221-7
245. Reed V, Boyd Y. Mutation analysis provides additional proof that mottled is the mouse homologue of Menkes' disease. *Hum Mol Genet*. 1997, 6(3):417-23
246. Rees EM, Lee J, Thiele DJ. Mobilization of intracellular copper stores by the CTR2 vacuolar copper transporter. *J Biol Chem*. 2004, 279(52):54221-9
247. Rosenzweig AC, O'Halloran TV. Structure and chemistry of the copper chaperone proteins. *Curr Opin Chem Biol*. 2000, 4(2):140-7
248. Rossi L, Ciriolo MR, Marchese E, De Martino A, Giorgi M, Rotilio G. Differential decrease of copper content and of copper binding to superoxide dismutase in liver, heart and brain of copper-deficient rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994, 203(2):1028-34
249. Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Corson LB, Becker M, Cleveland DW, Price DL, Culotta VC, Wong PC. The copper chaperone CCS is abundant in neurons and astrocytes in human and rodent brain. *J Neurochem*. 1999, 72(1):422-9
250. Royce PM, Camakaris J, Mann JR, Danks DM. Copper metabolism in mottled mouse mutants. The effect of copper therapy on lysyl oxidase activity in brindled (Mobr) mice. *Biochem J*. 1982, 202(2):369-71
251. Sadhra SS, Wheatley AD, Cross HJ. Dietary exposure to copper in the European Union and its assessment for EU regulatory risk assessment. *Sci Total Environ*. 2007, 374(2-3):223-34
252. Sarkar B, Lingertat-Walsh K, Clarke JT. Copper-histidine therapy for Menkes disease. *J Pediatr*. 1993, 123(5):828-30
253. Schmidt PJ, Rae TD, Pufahl RA, Hamma T, Strain J, O'Halloran TV, Culotta VC. Multiple protein domains contribute to the action of the copper chaperone for superoxide dismutase. *J Biol Chem*. 1999, 274(34):23719-25
254. Shiraishi N, Aono K, Taguchi T. Copper metabolism in the macular mutant mouse: an animal model of Menkes's kinky-hair disease. *Biol Neonate*. 1988, 54(3):173-80
255. Smeets B, Boor P, Dijkman H, Sharma SV, Jirak P, Mooren F, Berger K, Bornemann J, Gelman IH, Floege J, van der Vlag J, Wetzels JF, Moeller MJ. Proximal tubular cells contain a phenotypically distinct, scattered cell population involved in tubular regeneration. *J Pathol*. 2013, 229(5):645-59

256. Song IS, Chen HH, Aiba I, Hossain A, Liang ZD, Klomp LW, Kuo MT. Transcription factor Sp1 plays an important role in the regulation of copper homeostasis in mammalian cells. *Mol Pharmacol*. 2008, 74(3):705-13
257. Sokol RJ, Twedt D, McKim JM Jr, Devereaux MW, Karrer FM, Kam I, von Steigman G, Narkewicz MR, Bacon BR, Britton RS, et al. Oxidant injury to hepatic mitochondria in patients with Wilson's disease and Bedlington terriers with copper toxicosis. *Gastroenterology*. 1994, 107(6):1788-98
258. Srinivasan C, Posewitz MC, George GN, Winge DR. Characterization of the copper chaperone Cox17 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*. 1998, 37(20):7572-7
259. Steveson TC, Ciccotosto GD, Ma XM, Mueller GP, Mains RE, Eipper BA. Menkes protein contributes to the function of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase. *Endocrinology*. 2003, 144(1):188-200
260. Strausak D, Mercer JF, Dieter HH, Stremmel W, Multhaup G. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Res Bull*. 2001, 55(2):175-85
261. Strausak D, Howie MK, Firth SD, Schlicksupp A, Pipkorn R, Multhaup G, Mercer JF. Kinetic analysis of the interaction of the copper chaperone Atox1 with the metal binding sites of the Menkes protein. *J Biol Chem*. 2003, 278(23):20821-7
262. Sturtz LA, Diekert K, Jensen LT, Lill R, Culotta VC. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem*. 2001, 276(41):38084-9
263. Styrna J. Analysis of causes of lethality in mice with *ms (mosaic)* gene. *Genet. Polon*. 1977, 18, 61-97
264. Suzuki-Kurasaki M, Okabe M, Kurasaki M. Copper-metallothionein in the kidney of macular mice: a model for Menkes disease. *J Histochem Cytochem*. 1997, 45(11):1493-501
265. Takahashi Y, Kako K, Ohmura K, Tsumori K, Ohmasa Y, Kashiwabara S, Baba T, Munekata E. Genomic structure of mouse copper chaperone, COX17. *DNA Seq*. 2001, 12(5-6):305-18
266. Takahashi Y, Kako K, Kashiwabara S, Takehara A, Inada Y, Arai H, Nakada K, Kodama H, Hayashi J, Baba T, Munekata E. Mammalian copper chaperone Cox17p has an essential role in activation of cytochrome C oxidase and embryonic development. *Mol Cell Biol*. 2002, 22(21):7614-21

267. Tanaka K, Kobayashi K, Fujita Y, Fukuhara C, Onosaka S, Min K. Effects of chelators on copper therapy of macular mouse, a model animal of Menkes' kinky disease. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1990, 69(2):217-27
268. Tang J, Robertson S, Lem KE, Godwin SC, Kaler SG. Functional copper transport explains neurologic sparing in occipital horn syndrome. *Genet Med*. 2006, 8(11):711-8
269. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nat Genet*. 1995, 9(2):210-7
270. Tinkov AA, Ajsuvakova OP, Shehtman AM, Boev VM, Nikonorov AA. Influence of iron and copper consumption on weight gain and oxidative stress in adipose tissue of Wistar rats. *Interdiscip Toxicol*. 2012, 5(3):127-32
271. Tirzitis G, Bartosz G. Determination of antiradical and antioxidant activity: basic principles and new insights. *Acta Biochim Pol*. 2010, 57(2):139-42
272. Tonnesen T, Kleijer WJ, Horn N. Incidence of Menkes disease. *Hum Genet*. 1991, 86(4):408-10
273. Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J Am Diet Assoc*. 2001, 101(3):294-301
274. Tumer Z, Moller LB, Horn N. Mutation spectrum of ATP7A, the gene defective in Menkes disease. *Adv Exp Med Biol*. 1999, 448:83-95
275. Tumer Z, Moller LB. Menkes disease. *Eur J Hum Genet*. 2010, 18(5):511-8
276. Tumer Z. An overview and update of ATP7A mutations leading to Menkes disease and occipital horn syndrome. *Hum Mutat*. 2013, 34(3):417-29
277. Van den Berghe PV, Klomp LW. Posttranslational regulation of copper transporters. *J Biol Inorg Chem*. 2010, 15(1):37-46
278. Vairo FPE, Chwal BC, Perini S, Ferreira MAP, de Freitas Lopes AC, Saute JAM. A systematic review and evidence-based guideline for diagnosis and treatment of Menkes disease. *Mol Genet Metab*. 2019, 126(1):6-13

279. Varela-Nallar L, Toledo EM, Chacón MA, Inestrosa NC. The functional links between prion protein and copper. *Biol Res*. 2006, 39(1):39-44
280. Varabyova A, Topf U, Kwiatkowska P, Wrobel L, Kaus-Drobek M, Chacinska A. Mia40 and MINOS act in parallel with Ccs1 in the biogenesis of mitochondrial Sod1. *FEBS J*. 2013, 280(20):4943-59
281. Veldhuis NA, Gaeth AP, Pearson RB, Gabriel K, Camakaris J. The multi-layered regulation of copper translocating P-type ATPases. *Biometals*. 2009, 22(1):177-90
282. Voskoboinik I, Greenough M, La Fontaine S, Mercer JF, Camakaris J. Functional studies on the Wilson copper P-type ATPase and toxic milk mouse mutant. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001, 281(4):966-70
283. Vulpe C, Levinson B, Whitney S, Packman S, Gitschier J. Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nat Genet*. 1993, 3(1):7-13
284. Walker JM, Tsivkovskii R, Lutsenko S. Metallochaperone Atox1 transfers copper to the NH2-terminal domain of the Wilson's disease protein and regulates its catalytic activity. *J Biol Chem*. 2002, 277(31):27953-9
285. Wang Y, Hodgkinson V, Zhu S, Weisman GA, Petris MJ. Advances in the understanding of mammalian copper transporters. *Adv Nutr*. 2011, 2(2):129-37
286. West EC, Prohaska JR. Cu,Zn-superoxide dismutase is lower and copper chaperone CCS is higher in erythrocytes of copper-deficient rats and mice. *Exp Biol Med* (Maywood). 2004, 229(8):756-64
287. Wijmenga C, Klomp LW. Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proc Nutr Soc*. 2004, 63(1):31-9
288. Wong PC, Waggoner D, Subramaniam JR, Tessarollo L, Bartnikas TB, Culotta VC, Price DL, Rothstein J, Gitlin JD. Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97(6):2886-91
289. Woolf AS. The kidney [w:] Thorogood P (red.) Embryos, genes and birth defect. John Wiley & Sons Ltd. 1997, 303-326
290. Yoganathan S, Sudhakar SV, Arunachal G, Thomas M, Subramanian A, George R, Danda S. Menkes disease and response to copper histidine: An Indian case series. *Ann Indian Acad Neurol*. 2017, 20(1):62-68

291. Yoshimura N. Histochemical localization of copper in various organs of brindled mice. *Pathol Int.* 1994, 44(1):14-9
292. Yoshimura N, Kida K, Usutani S, Nishimura M. Histochemical localization of copper in various organs of brindled mice after copper therapy. *Pathol Int.* 1995, 45(1):10-8
293. Zaffanello M, Maffei C, Fanos V, Franchini M, Zamboni G. Urological complications and copper replacement therapy in childhood Menkes syndrome. *Acta Paediatr.* 2006, 95(7):785-90
294. Zatulovskaia YA, Ilyechova EY, Puchkova LV. The Features of Copper Metabolism in the Rat Liver during Development. *PLoS One.* 2015, 10(10):e0140797
295. Zhao J, Allee G, Gerlemann G, Ma L, Gracia MI, Parker D, Vazquez-Anon M, Harrell RJ. Effects of a chelated copper as growth promoter on performance and carcass traits in pigs. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2014, 27(7):965-73
296. Zhou B, Gitschier J. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94(14):7481-6
297. Zimnicka AM, Maryon EB, Kaplan JH. Human copper transporter hCTR1 mediates basolateral uptake of copper into enterocytes: implications for copper homeostasis. *J Biol Chem.* 2007, 282(36):26471-80
298. Zischka H, Lichtmannegger J, Schmitt S, Jagemann N, Schulz S, Wartini D, Jennen L, Rust C, Larochette N, Galluzzi L, Chajes V, Bandow N, Gilles VS, DiSpirito AA, Esposito I, Goettlicher M, Summer KH, Kroemer G. Liver mitochondrial membrane crosslinking and destruction in a rat model of Wilson disease. *J Clin Invest.* 2011, 121(4):1508-18